

MIKROKALORIMETRISCHE UNTERSUCHUNGEN

zum Einfluß von Anthracin und einiger Derivate

auf den Energiestoffwechsel

von Hefen

und von in vitro-Kulturen

dermalen Fibroblasten des Menschen

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung der Doktorwürde

des Fachbereichs Biologie

der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

MICHAEL PÄTEL

aus Berlin

1983



Digitized by the Internet Archive
in 2026

MIKROKALORIMETRISCHE UNTERSUCHUNGEN

zum Einfluß von Anthralin und einiger Derivate

auf den Energiestoffwechsel

von Hefen

und von in vitro-Kulturen

dermalen Fibroblasten des Menschen

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung der Doktorwürde

dem Fachbereich Biologie

der Freien Universität Berlin

1983

vorgelegt von

MICHAEL PÄTEL

aus Berlin

1.Referent: Prof. Dr. I. Lamprecht

2.Referent: Prof. Dr. B. Schaarschmidt

INHALTSVERZEICHNIS

1.	<u>EINLEITUNG</u>	1
1.1.	<u>Untersuchungen an in vitro-Kulturen von Hautzellen</u>	1
1.2.	<u>Energiestoffwechsel</u>	2
1.2.1.	<u>Allgemeines</u>	2
1.2.2.	<u>Energiestoffwechsel der Hefen</u>	4
1.2.3.	<u>Energiestoffwechsel der Haut</u>	5
1.2.4.	<u>Energiestoffwechsel von in vitro-Kulturen höherer Zellen</u>	6
1.3.	<u>Direkte und indirekte kalorimetrische Messungen</u>	7
1.3.1.	<u>Direkte Kalorimetrie</u>	7
1.3.2.	<u>Indirekte Kalorimetrie</u>	9
1.4.	<u>Psoriasis vulgaris und Anthralinwirkung</u>	9
1.5.	<u>Problemstellung</u>	11
2.	<u>MATERIAL UND METHODEN</u>	12
2.1.	<u>Biologisches Material und Kultivierung</u>	12
2.1.1.	<u>Fibroblasten</u>	12
2.1.2.	<u>Hefen</u>	14
2.2.	<u>Pharmaka und sonstige Substanzen</u>	15

2.2.1.	<u>Pharmaka</u>	15
2.2.2.	<u>Biochemische Testsubstanzen</u>	17
2.2.3.	<u>Sonstige Substanzen</u>	17
2.3.	<u>Versuchsvorbereitungen</u>	18
2.3.1.	<u>Versuche mit Fibroblasten</u>	18
2.3.2.	<u>Versuche mit Hefen</u>	25
2.4.	<u>Geräte und Versuchsdurchführung</u>	25
2.4.1.	<u>Untersuchungen im Batch-Kalorimeter</u>	25
2.4.2.	<u>Untersuchungen im Flow-Kalorimeter</u>	28
2.4.3.	<u>Untersuchungen im Warburg-Gerät</u>	29
2.4.4.	<u>Untersuchungen mit der Sauerstoff- elektrode</u>	30
2.4.5.	<u>Untersuchungen zur Laktatbildung und zum Glukoseverbrauch</u>	32
2.4.6.	<u>Untersuchungen zur Überlebensrate</u>	32
3.	<u>ERGEBNISSE - UNTERSUCHUNGEN AN FIBROBLASTEN</u>	33
3.1.	<u>Wärmeproduktion einer proliferierenden Kultur</u>	33
3.1.1.	<u>Folienkulturen im Batch-Kalorimeter</u>	33
3.1.2.	<u>Kulturen auf Microbeads im Flow- Kalorimeter</u>	37
3.2.	<u>Wärmeproduktion nicht proliferierender Kulturen</u>	38
3.2.1.	<u>Untersuchungen in der stationären Phase - ohne Zugabe von Pharmaka</u>	38

3.2.2.	<u>Untersuchungen in der stationären Phase - nach Zugabe von Anthralin</u>	42
3.2.3.	<u>Untersuchungen in der stationären Phase - nach Zugabe von Anthralinderivaten</u>	44
3.3.	<u>Sauerstoffverbrauch nicht proliferierender Kulturen</u>	45
3.3.1.	<u>Polarographische Untersuchungen mit der Sauerstoffelektrode</u>	45
3.3.2.	<u>Manometrische Untersuchungen mit Glasgefäßen</u>	48
3.3.3.	<u>Manometrische Untersuchungen mit Plastikgefäßen</u>	50
3.4.	<u>Kohlendioxidbildung und R.Q.-Wert</u>	50
3.5.	<u>Laktatbildung und Glukoseverbrauch</u>	51
3.6.	<u>Überlebensfähigkeit</u>	53
4.	<u>ERGEBNISSE - UNTERSUCHUNGEN AN HEFEN</u>	54
4.1.	<u>Wärmeproduktion proliferierender Kulturen</u>	54
4.1.1.	<u>Untersuchungen im Batch-Kalorimeter</u>	54
4.1.2.	<u>Untersuchungen im Flow-Kalorimeter</u>	56
4.2.	<u>Wärmeproduktion nicht proliferierender Kulturen</u>	58
4.3.	<u>Flow-kalorimetrische Untersuchungen zur</u>	

	<u>Anthralinstabilität und -aufnahme</u>	61
4.4.	<u>Sauerstoffverbrauch nicht proliferierender Kulturen</u>	63
4.4.1.	<u>Untersuchungen mit der Sauerstoff-elektrode</u>	63
4.4.2.	<u>Untersuchungen mit dem Warburg-Gerät</u>	66
4.5.	<u>Kohlendioxidproduktion nicht proliferierender Kulturen</u>	67
4.6.	<u>Cytotoxische Effekte der Anthralinbehandlung</u>	68
5.	<u>DISKUSSION</u>	71
5.1.	<u>Wachsende Fibroblastenkulturen</u>	71
5.2.	<u>Adaptation von Fibroblasten an anerobe Bedingungen</u>	73
5.3.	<u>Energiestoffwechsel konfluenter Fibroblastenkulturen</u>	76
5.3.1.	<u>Wärmeproduktion</u>	76
5.3.2.	<u>Sauerstoffverbrauch</u>	78
5.3.3.	<u>Kohlendioxidbildung und R.Q.-Werte</u>	82
5.4.	<u>Energetische Bilanz direkter und indirekter Kalorimetrie an Fibroblasten</u>	85
5.5.	<u>Anthralin-Einfluß auf konfluente Fibroblastenkulturen</u>	87
5.5.1.	<u>Wirkungsspektrum</u>	87
5.5.2.	<u>Einfluß des Sauerstoffs</u>	94

5.5.3.	<u>Anthralinstabilität und -aufnahme, Irreversibilität der Effekte und Anthralinresistenz</u>	96
5.6.	<u>Anthralin-Einfluß auf Hefekulturen</u>	98
5.6.1.	<u>Einfluß auf proliferierende Kulturen</u>	98
5.6.2.	<u>Einfluß auf ruhende Kulturen</u>	99
5.6.3.	<u>Anthralinaufnahme, Einfluß des Zell- titers und des Alters der Anthralin- lösung</u>	103
5.7.	<u>Vergleich der Anthralin-Wirkung auf den Stoffwechsel von Fibroblasten und von Hefen</u>	104
5.8.	<u>Kalorimetrischer Screening-Test zur Wirkung von Pharmaka auf Zellkulturen des Menschen</u>	107
6.	<u>ZUSAMMENFASSUNG - SUMMARY - RESUME</u>	110
7.	<u>LITERATURVERZEICHNIS</u>	114
	<u>ANHANG</u>	121

1. EINLEITUNG

1.1. Untersuchungen an in vitro-Kulturen von Hautzellen

Die Kritik an Untersuchungen von Hautkulturen rührt im wesentlichen daher, daß die Haut als Organ sehr heterogen ist. Selbst wenn man sich bei in vitro-Untersuchungen auf ein Gewebestück beschränkt, ergibt sich aus der Dicke der Probe eine Diffusionsabhängigkeit exogener Substrate. Das Vorliegen verschiedenartiger Zellen in der Gewebepopulation sowie die unterschiedlichen Differenzierungsstadien gleichartiger Zellen erhöhen die Heterogenität der Probe. Insbesondere Untersuchungen zum Wirkungsmechanismus von Pharmaka werden deshalb schwer interpretierbar.

Bei Untersuchungen an Zellkulturen der Haut bestehen viele dieser Probleme nicht.

Hauptzelltyp der Epidermis und der Dermis sind Keratinozyten bzw. Fibroblasten. Da die Kultur dermalen Fibroblasten technisch einfacher ist als die Kultur von Keratinozyten, werden diese häufig für genetische und biochemische Untersuchungen benutzt. Zusammenfassende Darstellungen zur Kultur, zur Biologie und zum Stoffwechsel dermalen Fibroblasten findet man bei Sly & Grubb (1979), Martin (1973), Hayflick (1973) und Ham (1980).

Die Mehrzahl aller Untersuchungen an Fibroblasten wurde an proliferierenden Kulturen durchgeführt. In situ haben Fibroblasten aber mit Ausnahme der Wundheilung keine oder sehr geringe mitotische Aktivitäten (Dell'Orco et al., 1973). In vitro-Untersuchungen an nicht wachsenden Kulturen kommen der

in vivo-Situation deshalb näher.

In dieser Arbeit wurden daher alle Versuche - bis auf einige Untersuchungen zur Vermehrung der Fibroblasten - an nicht proliferierenden Kulturen vorgenommen.

1.2. Energiestoffwechsel

1.2.1. Allgemeines

Das herausragende Substrat des Energiestoffwechsels ist die Glukose. Viele Zellen können sie sowohl anaerob, d.h. ohne Beteiligung von Sauerstoff, als auch aerob, d.h. durch Verbrennung mit Sauerstoff, abbauen.

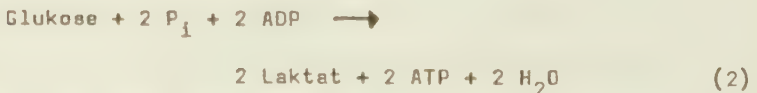
Der anaerobe Abbau erfolgt über den Embden-Meyerhof-Parnass-Weg (EMP-Weg) und führt bei Hefen zum Ethanol und beim Menschen zur Milchsäure. Dieser Weg wird auch anaerobe Glykolyse oder nach seinem Endprodukt alkoholische Gärung bzw. Milchsäuregärung genannt.

Unabhängig vom Endprodukt ist die exergonische Reaktion mit der Bildung von zwei Mol ATP pro Mol Glukose gekoppelt:

Alkoholische Gärung:

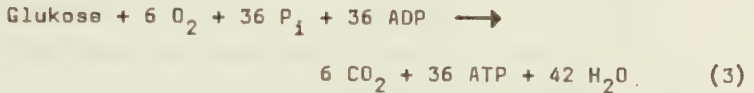


Milchsäuregärung:



Wenn den Zellen Sauerstoff zur Verfügung steht, können die Endprodukte der Gärung oder das Pyruvat der Glykolyse zum Ausgangspunkt des aeroben Abbaus werden. Der sauerstoff-

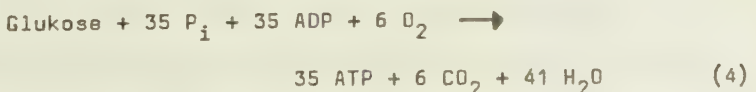
abhängige Glukoseabbau läuft in den Mitochondrien ab und wird in die Teilschritte Krebszyklus oder Zitronensäurezyklus und Atmungskette eingeteilt. Die Gesamtreaktion kann vereinfacht mit folgender Gleichung dargestellt werden:



Da der aerobe Abbau ca. 18mal soviel ATP liefert wie der anaerobe Abbau, sollte die "energiebewußte" Zelle atmen, sofern Sauerstoff vorhanden ist. Tatsächlich minimalisieren viele Zellen ihre Glukosedegradation bei ausreichender Sauerstoffversorgung (Pasteur-Effekt), da Atmungsprozesse dominieren. Lediglich sehr hohe Glukosekonzentrationen veranlassen die Zellen dann, Glukose trotz hinreichenden Sauerstoffangebots zu vergären (Crabtree-Effekt).

Ein weiterer Abbauweg der Glukose ist der Hexose-Mono-phosphat-Shunt (HMP-Shunt) oder Pentose-Phosphat-Zyklus. Er verläuft parallel zur Glykolyse und zum Krebszyklus. Seine beiden wichtigsten Aufgaben sind die Bereitstellung von NADPH im extramitochondrialem Plasma und die Bildung von Pentosen aus Hexosen. Glukose-6-Phosphat kann über den HMP-Shunt aber auch vollständig zu Kohlendioxid veratmet werden.

Ob der HMP-Shunt vornehmlich NADPH, CO_2 oder Pentosen produziert hängt wesentlich vom Bedürfnis der Zellen ab. Da nicht wachsende Zellen einen minimalen Synthesebedarf haben, dürfte die vollständige Oxidation der Glukose überwiegen. Gleichung (4) faßt diesen Prozeß zusammen:



Gegenüber dem Krebszyklus bilden also Zellen pro Mol Glukose ein Mol ATP weniger.

Bei der Glukoseoxidation werden pro Mol Glukose 6 Mol Sauerstoff verbraucht und 6 Mol Kohlendioxid erzeugt. Die Gasbilanz ist also ausgeglichen. Bei der alkoholischen Gärung wird nur Kohlendioxid produziert, während bei der Laktatgärung kein Gasaustausch stattfindet.

Das Verhältnis aus gebildetem Kohlendioxid und verbrauchtem Sauerstoff heißt Respiratorischer Quotient (R.Q.). Tab. 1 gibt die R.Q.-Werte sowie die kalorischen Äquivalente für die Veratmung verschiedener Substrate an.

Tab. 1: Sauerstoffkalorienäquivalent und R.Q.-Wert für verschiedene Atmungssubstrate (verändert nach Kleiber, 1967)

Substrat	Sauerstoffkalorienäquivalent	R.Q.-Wert
Fette	20 kJ/1 O_2	0,71
Proteine	19 kJ/1 O_2	0,80
Kohlenhydrate	21 kJ/1 O_2	1

1.2.2. Energiestoffwechsel der Hefen

Hefen sind - vor allem was ihren Energiestoffwechsel betrifft - die zur Zeit am besten untersuchten Eukaryoten (Mills & Krebs, 1965, Rose & Harrison, 1969) und beim Vergleich mit menschlichen Zellen den prokaryotischen Bakterien vorzuziehen. Wegen ihrer einfachen Kultur sind Hefen ein häufig benutztes Modell höherer Zellen (Reis, 1975).

Hefen können Glukose anaerob bis zum Ethanol oder aerob bis zum Kohlendioxid abbauen. Da über den HMP-Shunt nach Lagunas (1979) nur maximal 2,5 % der Glukose umgesetzt wird, ist bei Hefen der Krebszyklus für die Glukoseoxidation verantwortlich.

In 5 mM Glukosepuffer wird Glukose bei ausreichendem Sauerstoffangebot fast ausschließlich veratmet. Sehr hohe Glukosekonzentrationen (z.B. 100 mM) verringern den Sauerstoffverbrauch der Kultur und erhöhen die Gärungsaktivität der Hefen. Dank eines ausgeprägten Crabtree-Effekts kann also durch die Wahl der Glukosekonzentration der Gärungs- bzw. Atmungsanteil der Hefepopulation vorgegeben werden.

Einen Überblick über kalorimetrische Untersuchungen zum Energiestoffwechsel der Hefen findet man bei Lamprecht (1980).

1.2.3. Energiestoffwechsel der Haut

Auch bei der Haut steht die Rolle der Glukose als wichtigstes Energiesubstrat außer Frage (Banks, 1979, S. 270, Herrmann, 1973, S. 60).

Sowohl für die Dermis als auch für die Epidermis konnten die Enzymmuster der Glykolyse und des Krebszyklus nachgewiesen werden (Mier & Cotton, 1976, S. 37ff). In welchem Ausmaß menschliche Haut diese Wege in vivo tatsächlich benutzt, ist nicht bekannt. Ebenfalls gesichert ist, daß die Haut über einen recht aktiven HMP-Shunt verfügt (Freinkel, 1960, Pomerantz & Asbornsen, 1961).

An Rinderhaut konnte Gilbert (1962) nachweisen, daß Proteine etwa 25% des endogenen Atmungssubstrats ausmachen. Exogenes Glukoseangebot verringert die Oxidation von Aminosäuren. Nach Gilbert sowie Yardley & Godfrey (1964) kann Haut

auch Lipide in hohem Maße veratmen.

Mier & Cotton (1976) haben die Vermutung geäußert, daß Glukose gar nicht über den Krebszyklus abgebaut werden kann, da zwischen Pyruvat und Acetyl-CoA ein absoluter Block besteht. Im Krebszyklus sollen vor allem Lipide und Aminosäuren metabolisiert werden, während der Glukose der EMP-Weg bzw. der HMP-Shunt zur Verfügung steht.

1.2.4. Energiestoffwechsel von in_vitro-Kulturen höherer Zellen

Über den Energiestoffwechsel von Zellkulturen des Menschen liegen nur wenige Ergebnisse vor. Dies mag einerseits an technischen Schwierigkeiten liegen, die mit der Kultur höherer Zellen verbunden sind, und andererseits am Mangel an einfachen Medien, die es erlauben, den Energiestoffwechsel in Abhängigkeit einer einzigen Energiequelle zu verfolgen.

Zu den technischen Schwierigkeiten gehört u.a. das Bedürfnis normaler diploider Säugetierzellen nach einem Substrat, an dem sie anhaften können. Hierfür eignen sich Glas und Plastikoberflächen, die eine positive Ladung besitzen. Die Transformation normaler Zellen in Zellen, die in einfach zu handhabenden Suspensionskulturen wachsen, ist gewöhnlich mit einer Änderung wichtiger Zelleigenschaften verbunden (abnorme Chromosomenzahl, unbeschränkte Kulturdauer usw.). Diese etablierten Zelllinien ähneln daher eher Krebszellen und ihr Stoffwechsel ist von dem normaler Zellen verschieden.

In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb ein Stamm gewählt, der Kontaktinhibition zeigt und eine begrenzte

Lebensspanne besitzt.

Außer Salzen, Zucker, Aminosäuren und Vitaminen benötigen Säugetierzellen in Kultur auch Serum, dessen Zusammensetzung sehr komplex ist. Als Energiesubstrate können neben Glukose auch Aminosäuren, Fettsäuren und intermediäre Metabolite verwertet werden (Oizumi et al., 1981, Montini et al., 1981, Reitzer et al., 1980, Zielke et al., 1978, Donnelly & Scheffler, 1976).

Der Sauerstoffverbrauch einer Zellkultur hängt nicht nur von den Zellen selbst ab, sondern auch viele äußere Faktoren (Medium, Kulturtechnik, Sauerstoffpartialdruck, Serumgehalt usw.) spielen eine Rolle (Epshtein, 1978, Werrlein & Glinos, 1974, Ciesielski-Treska, 1972).

Messungen des Gassstoffwechsels an Säugetierzellen erfassen nicht die Milchsäuregärung, die über die Laktatproduktion bestimmt werden kann. Vom R.Q.-Wert vertebraler Zellen kann direkt auf das Atmungssubstrat geschlossen werden, da die Gärung keine Änderung der Gaskonzentrationen bewirkt.

1.3. Direkte und indirekte kalorimetrische Messungen

1.3.1. Direkte Kalorimetrie

Unter direkter Kalorimetrie versteht man Untersuchungen, die mit Kalorimetern durchgeführt werden. Das Thermogramm entspricht der Summe aller Enthalpieänderungen der im System ablaufenden Reaktionen. Zur besseren Erfassung biologischer Prozesse (katabolischer Abbau, anabolische Synthese, Erhaltung, Funktion, Reparatur, Transport) muß versucht werden, störende physikalische und chemische Effekte, wie sie z.B. bei Verdampfungs- und Lösungsprozessen auftreten, zu vermeiden.

Die Kalorimetrie ist eine unspezifische Methode, mit der man auch nicht erwartete Effekte erfassen kann. Sie sollte deshalb am Anfang einer Untersuchung stehen. Andere, spezifischere Methoden liefern Detailaussagen zum Stoffwechsel.

Viele Fragestellungen konnten mit Kalorimetern, insbesondere bei Untersuchungen an Mikroorganismen, geklärt werden (Belaich, 1980, Lamprecht, 1980, Newell, 1980, Bettelheim & Shaw, 1980). Auch zur Charakterisierung der Wirksamkeit von Chemotherapeutika wurde die Kalorimetrie in der Mikrobiologie vielfach eingesetzt (Semenitz, 1977, Beezer & Chowdhry, 1980).

Kalorimetrische Untersuchungen an in vitro-Kulturen höherer Zellen sind weniger verbreitet als Versuche an Mikroorganismen. Dies mag daran liegen, daß es nur wenige geeignete Kalorimeter gibt, die den Kulturanforderungen vertebraler Zellen genügen (Kemp, 1980).

Eine Zusammenfassung bisheriger Arbeiten zur Wärmeentwicklung von Organ- und Gewebekulturen gibt Woledge (1980). Spezielle Untersuchungen an Haut wurden von Hellgren et al. (1977), Anders et al. (1977) und Anders et al. (1979) vorgenommen.

Kemp (1980) berichtet über Ergebnisse mikrokalorimetrischer Versuche an in vitro-Kulturen höherer Zellen. Erste kalorimetrische Messungen an dermalen Fibroblasten des Menschen haben Pätel et al. (1980), Schaarschmidt & Reichert (1981), Pätel (1981) und Pätel et al. (1982) durchgeführt.

1.3.2. Indirekte Kalorimetrie

Indirekte kalorimetrische Messungen basieren auf Untersuchungen, bei denen keine Enthalpieänderungen gemessen werden, sondern die Wärmeabgabe erst mit thermodynamischen Daten aus anderen Parametern errechnet wird.

Zu den indirekten kalorimetrischen Messungen zählen u.a. die Manometrie und die Polarographie.

Mit manometrischen Messungen nach Warburg (1926) können gleichzeitig Sauerstoffverbrauch und Kohlendioxidproduktion bestimmt werden. Mit der von Clark (1956) beschriebenen Sauerstoffelektrode wird kontinuierlich die Menge des gelösten Sauerstoffs ermittelt. Eine theoretische Einführung zur Manometrie, Polarographie und Photometrie sowie zu weiteren Techniken, die für Untersuchungen des Gewebestoffwechsels geeignet sind, geben Umbreit et al. (1972).

Polarographische Bestimmungen der Sauerstoffverbrauchsrate haben gegenüber manometrischen Bestimmungen den Vorteil, daß bis zu 10mal mehr Meßdaten pro Zeiteinheit gewonnen werden können (Johnson, 1972), wobei der Meßunterschied zwischen den beiden Methoden in der Regel 5 % nicht überschreitet. Versuche mit der Sauerstoffelektrode sind wegen ihrer Schnelligkeit vor allem für Screening-Tests interessant, wurden aber in diesem Zusammenhang noch nicht an Kulturen höherer Zellen durchgeführt.

1.4. Psoriasis vulgaris und Anthralinwirkung

Psoriasis ist die am häufigsten auftretende Hautkrankheit des Menschen. Sie ist genetisch determiniert.

Der gesamte Stoffwechsel psoriatischer Haut ist gegenüber dem normaler Haut erhöht. Die Turnover-Rate epidermaler Zellen ist von ca. 28 Tage auf nur 3 bis 4 Tage verkürzt. Der Sauerstoffverbrauch der betroffenen Haut ist verglichen mit gesunder Haut verdoppelt, die Kohlendioxidproduktion vervierfacht und der Prozentsatz zu Laktat umgewandelter Glukose etwas geringer (Herdensamm, 1962). In psoriatischer Haut ist also vor allem der oxidative Glukoseabbau erhöht.

Anthralin ist sicherlich das zur Zeit wirksamste Therapeutikum der chronischen Psoriasis. Es findet seit mehr als sechs Jahrzehnten Anwendung. Neben Anthralin (1,8-Dihydroxy-9-Anthron) zeigen aber auch die Verbindungen Chrysarobin (1,8-Dihydroxy-3-Methyl-9-Anthron) und 1-Hydroxy-9-Anthron antipsoriatische Wirkung. Letzteres besitzt nach Krebs & Schaltegger (1969) die Minimalstruktur antipsoriatischer Aktivität.

Der Wirkungsmechanismus von Anthralin ist noch weitestgehend ungeklärt. Auch bezüglich der aktiven Form besteht noch Unklarheit. In vitro und in vivo unterliegt Anthralin einer Reihe von Oxidations- und Dekompositionsprozessen, die zum Teil chromatographisch nicht identifizierbare Produkte liefern (Cavey et al., 1981, Jacques & Reichert, 1981).

Nach Swanbeck & Thyresson (1965) sowie Swanbeck & Zetterberg (1971) bindet Anthralin an DNA. In Untersuchungen an Hefen haben Gillberg et al. (1967) und Zetterberg (1977) daraufhingewiesen, daß Anthralin auf normale atmungsfähige Zellen anders wirkt als auf atmungsdefekte Hefen (sogenannte petites).

1.5. Problemstellung

In der vorliegenden Arbeit soll der Energiestoffwechsel von in vitro-Kulturen dermalen Fibroblasten des Menschen charakterisiert werden. Dabei ist in erster Linie an kalorimetrische Untersuchungen gedacht. Parallel durchzuführende manometrische, polarographische und photometrische Versuche sollen die kalorimetrischen Aussagen ergänzen.

Die Wärmeabgabe proliferierender und nicht proliferierender Fibroblastenkulturen soll untersucht werden. Es ist zu ermitteln, wie Fibroblasten Energiesubstrate verwerten können. Insbesondere ist geplant, die Anteile von Atmung und Gärung unter verschiedenen Kulturbedingungen zu bestimmen.

Um die Wärmeproduktion zu beeinflussen, ist die Zugabe dermatologisch interessanter Pharmaka vorgesehen. Es soll versucht werden, die Wirkung dieser Pharmaka mit den genannten Methoden zu erfassen. Kalorimetrische Messungen sollen soweit vereinfacht und standardisiert werden, daß mit ihnen Screening-Tests durchgeführt werden können, die es erlauben, pharmakologisch relevante Produkte schnell auf ihre Wirkung auf Zellkulturen zu prüfen.

Insbesondere sollen auch Einblicke in die Anthralinwirkung auf den Energiestoffwechsel gewonnen werden. Gleichartige Untersuchungen an Hefen sollen den Modellcharakter dieser Organismen beleuchten und versuchen, die Allgemeingültigkeit einiger Anthralineffekte zu klären.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Biologisches Material und Kultivierung

2.1.1. Fibroblasten

Bezugsquelle und Stammhaltung:

Vorhautfibroblasten des Menschen der Linie Flow 7000 (Flow Laboratories, Asnières, Frankreich) wurden in der 12. Passage bezogen, an das hier verwendete Medium adaptiert und bis zur 35. Passage für Versuche benutzt.

Die Kultivierung der Stammkultur erfolgte in Monolayer-Technik bei 37 °C durch 1:4-Splits. Es wurden 75 cm² große Plastikkulturgefäße (Corning Glass Works, New York, USA) benutzt. Alle 48 Stunden wurde das Medium der Stammkultur erneuert.

Medium und Puffer:

Als Basismedium für Untersuchungen des Wachstums- und des Betriebsstoffwechsels diente Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM 10x, Gibco Bio-Cult, Paisley, Großbritannien), das außerdem folgende Zusätze enthielt:

760 mg	NaHCO ₃ /l (9mM)
584 mg	L-Glutamin/l (2mM)
6 g	HEPES [*] /l (40mM)
100.000 Einheiten	Penicillin/l
100 mg	Streptomycin/l
250 µg	Amphotericin B/l
15 % (V/V)	Fötales Kälberserum (Gibco)

* HEPES: N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-ethansulfonsäure

Der pH wurde mit einer NaOH-Lösung auf 7,4 eingestellt. Im folgenden wird das gebrauchsfertige Fibroblastenmedium mit KM abgekürzt.

Zum Waschen der Zellen wurde ein Puffer aus Hank's Balanced Salt Solution (HBSS 10x, Gibco) benutzt. Ein Liter fertige HBSS-Lösung enthält:

100 ml	HBSS (ohne Ca^{++} , Mg^{++} , NaHCO_3)
350 mg	NaHCO_3 (4mM)

Das Trypsinieren der Zellen erfolgte mit einer HBSS-Lösung, die 0,25 % (G/V) Trypsin enthält.

Alle Lösungen wurden unmittelbar nach ihrer Herstellung mit Filtern (Millipore Corp., Massachusetts, USA) der Porengröße 0,45 μm sterilfiltriert und dann bei 4 °C aufbewahrt. Die Antibiotika sowie das Serum wurden erst kurz vor der Verwendung des Mediums hinzugefügt.

Zellgewinnung:

Zur Ernte der Zellen wurden die Stammkulturen gegen Ende der logarithmischen Wachstumsphase einmal mit HBSS gewaschen und dann ca. 10 Minuten lang bei 37 °C mit 2 ml HBSS-Trypsin-Lösung inkubiert.

Während dieser Behandlung lösten sich die Zellen ab. Zur Gewinnung aller Zellen wurde die Zellsuspension in ein Zentrifugenglas gegeben und die Kulturflasche mit 4 ml KM nachgespült, was gleichzeitig die Trypsinierungsreaktion stoppte.

Die geernteten Zellen wurden bei 600 g etwa 5 Minuten lang zentrifugiert und dann erneut in KM aufgenommen. Mehrfaches Aufziehen der Zellsuspension mit einer Pipette ergab

eine Suspension von Einzelzellen.

Mit ungefähr 75 % der geernteten Zellen wurden Subkulturen für Versuchszwecke angelegt, während 25 % der Zellen zur Fortführung der Stammkultur erforderlich waren. Überzählige Zellen wurden tiefgefroren und bei Bedarf wieder aufgetaut.

Tiefgefrieren:

Zum Tiefgefrieren wurden 1 ml Zellsuspension ($2 \cdot 10^6$ Zellen/ml), 0,66 ml fötales Kälberserum und 0,33 ml DMSO* zusammen in ein Zentrifugenglas pipettiert, auf -20°C vorgekühlt und dann bei -70°C gelagert.

Das Auftauen geschah in einem Wasserbad von 20°C . Nach Zugabe von 6 ml KM ins Zentrifugenglas erfolgte die Elimination des DMSO durch Zentrifugieren der Kultur bei 600 g für 5 Minuten. Die Zellen wurden in KM aufgenommen und für Kulturzwecke verwendet.

2.1.2. Hefen

Alle Versuche an Hefen wurden mit einer käuflichen Hefe (Super Levure Alsacienne, 500 g, Levure fala, Straßburg, Frankreich) durchgeführt. Diese Hefe klumpt nicht und die Knospen lösen sich schnell von der Mutterzelle. Bis zu ihrer Verwendung wurden die Hefen im Kühlschrank bei ca. 4°C gelagert.

Zum Waschen und für Untersuchungen des Betriebsstoffwechsels wurde ein $0,05\text{ M KH}_2\text{PO}_4$ -Puffer benutzt, der entweder 2 % (G/V) Glukose (100 mM), 0,1 % (G/V) Glukose (5 mM) oder gar keine Glukose enthielt. Im weiteren werden diese

* DMSO: Dimethylsulfoxid

Medien folgendermaßen abgekürzt: 100 mM-GPP, 5 mM-GPP bzw. PP.

Für die Wachstumsversuche wurde ein flüssiges Vollmedium (VM) benutzt, das folgende Zusammensetzung hat:

5,0 g	Yeast-Extrakt (Difco)
2,5 g	Pepton (Merck)
10,0 g	Glukose
500,0 ml	entmineralisiertes Wasser

Die Medien wurden 20 Minuten lang bei 123 °C im Autoklaven sterilisiert.

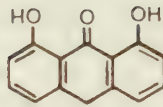
2.2. Pharmaka und sonstige Substanzen

2.2.1. Pharmaka

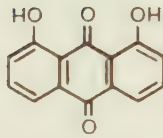
Folgende Pharmaka wurden eingesetzt (s. Abb.1, S.16):

- 1,8-Dihydroxy-9-Anthron oder Anthralin, Dithranol, Cignolin,
- 1,8-Dihydroxy-Anthraquinon oder Anthraquinon,
- 1,8,1',8'-Tetrahydroxy-10,10'-Dianthron oder Anthralindimer,
- 10-Acetyl-Anthralin und
- Dimethyl (1,8-Dihydroxy-Anthr-9-on-10yl)-Maleat.

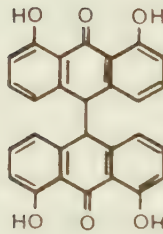
Da Anthralin in Gegenwart von Licht, bei neutralem pH und in wässrigem Milieu sehr schnell zu zerfallen scheint, ist die Wahl des Lösungsmittels wichtig. Die Löslichkeit und Stabilität von Anthralin wurden von Cavey et al. (1981) untersucht. Die meisten dort angegebenen Lösungsmittel sind toxisch und für Untersuchungen an lebenden Zellen ungeeignet.



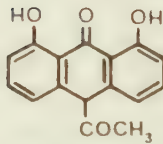
1



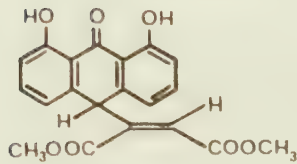
2



3



4



5

Abb. 1: Untersuchte Pharmaka:

		Summenformel	Molekulargewicht
1	Anthralin	$C_{14}H_{10}O_3$	226
2	Anthraquinon	$C_{14}H_8O_4$	240
3	Anthralindimer	$C_{28}H_{18}O_6$	452
4	Acetylanthralin	$C_{16}H_{12}O_4$	268
5	Anthralinmaleat	$C_{20}H_{16}O_7$	368

- 17 -

Konzentrierte Essigsäure schien als gemeinsames Lösungsmittel aller Pharmaka am geeignetsten zu sein.

Zur Herstellung der Stammlösung wurden 10 mg des Produkts auf einen ml Essigsäure eingewogen und dann drei Minuten lang kräftig geschüttelt. Die Stammlösungen sind über viele Stunden stabil. Über Ergebnisse chromatographischer Untersuchungen zur Löslichkeit und Stabilität von Anthralin unter den hier vorliegenden Bedingungen wird im ersten Teil des Anhangs (s.S. 121) berichtet.

Die Konzentration der Essigsäure im Medium betrug bei Fibroblastenversuchen maximal 0,1 % (V/V) und bei Hefeversuchen maximal 0,2 % (V/V). Nach Zugabe des Pharmakons zum Medium wurde mit einer 10 N NaOH-Lösung neutralisiert.

In Kontrollversuchen wurde zum Medium die entsprechende Menge des Lösungsmittels gegeben. In den Abbildungen wird auf diesen Umstand hingewiesen, indem eine Zugabe des Pharmakons von 0 μ M vermerkt ist.

2.2.2. Biochemische Testsubstanzen

Zur Bestimmung der Glukosekonzentration im KM der Fibroblasten wurde die Test-Kombination Glukose (GOD-Perid-Methode, Best. Nr. 124.010, Boehringer, Mannheim) benutzt.

Die Laktatkonzentration im Medium wurde mit der Test-Kombination Laktat (Best. Nr. 124.842, Boehringer) ermittelt. Die Bestimmungen erfolgten nach den Anweisungen des Herstellers.

2.2.3. Sonstige Substanzen

Trypanblau, 0,4 %, (1:6), (Gibco),

Trypsin (Pankreasprotease), 2000 E/g, (Merck),

DMSO (Dimethylsulfoxid), C_2H_6OS , (Merck),

Natrium-Dithionit,

PBS-Lösung (Phosphate buffered saline) mit 8,2 g NaCl/
1 H₂O, 0,4 g KCl/ 1 H₂O und 2,84 g Na₂HPO₄/ 1 H₂O.

2.3. Versuchsvorbereitungen

2.3.1. Versuche mit Fibroblasten

Allgemeines:

Für die einzelnen Versuche mußten die Zellen auf verschiedene Materialien gesät werden. In Abhängigkeit des benutzten Geräts mußten deshalb ganz unterschiedliche Kulturtechniken für die Subkulturen benutzt werden.

Eine flexible Plastikfolie (Sterilin Nr. 337, Teddington, Großbritannien) wurde für Versuche im Batch-Kalorimeter verwendet. Für flow-kalorimetrische Untersuchungen wurden Zellkulturen auf Microbeads (Cytodex 1, Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Schweden) angelegt. Für manometrische Untersuchungen wurden die Fibroblasten direkt in die Glasgefäße der Warburg-Apparatur gesät. Schließlich wurden auch Plastikkulturröhrchen (Corning) eingesetzt, die bei Versuchen im Batch-Kalorimeter, in der Warburg-Apparatur, in der Sauerstoffelektrode und bei den photometrischen Bestimmungen der Glukose- bzw. Laktatkonzentration des Mediums Anwendung fanden. Mit den Plastikröhrchen stand den Zellen also bei fünf Methoden das gleiche Substrat zum Anhaften zur Verfügung, so daß substrat-abhängige Meßunterschiede in den Methoden von vornherein ausgeschlossen. Darüberhinaus waren hier auch die Anzuchtbedingungen identisch.

In der Regel wurde beim Anlegen der Subkulturen so vorgegangen, daß für Versuche zum Betriebsstoffwechsel die Zellen

sehr dicht gesät wurden, damit die gesamte zur Verfügung stehende Fläche schnell zu einer Einschichtkultur wachsen konnte.

Bei Untersuchungen zum Wachstum der Fibroblasten wurde mit einer geringeren Anfangsdichte begonnen, um den Zellen 2-4 Teilungen zu ermöglichen, bevor Konfluenz erreicht war. Das Zusammenwachsen des Zellrasens konnte deshalb über mehrere Tage verfolgt werden.

Versuche mit der Plastikfolie:

Die Folientechnik wurde, ähnlich wie sie Schaarschmidt & Reichert (1981) beschrieben haben, für Versuche im Batch-Kalorimeter angewandt.

Die 5 cm x 6,5 cm große Plastikfolie wurde bis zu ihrer Verwendung in reinem Ethanol gelagert, dann an der Luft getrocknet und in einen Rahmen gelegt (Abb. 2). Der Rahmen wurde durch Autoklavieren bei 123 °C sterilisiert. Er besteht aus zwei Teilen, zwischen denen die Folie eingelegt

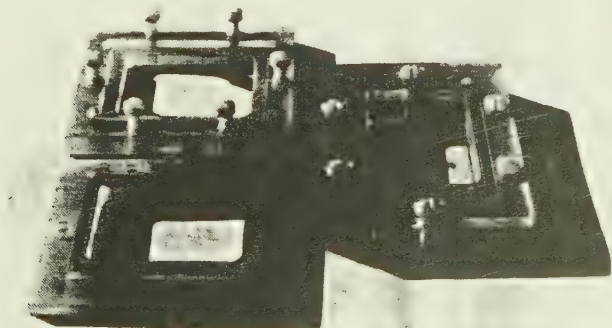


Abb. 2: Leere Rahmenhälften und ein verschraubter Rahmen mit Folie

wird. Durch das Anziehen der sechs Schrauben preßt sich der Dichtungsring des oberen Rahmenteils an die Folie, so daß diese zum Rand hin fest abgeschlossen ist. Zum Auftragen des Inokulums steht daher nur noch eine Fläche von ca. $4,5 \text{ cm} \times 6 \text{ cm} = 27 \text{ cm}^2$ zur Verfügung.

Die aufgetragene Zellzahl liegt zwischen $0,5 \cdot 10^6$ und $3 \cdot 10^6$ Fibroblasten, wobei das Kulturvolumen immer 7 ml beträgt. Der Rahmen mit der eingespannten Folie wurde in einer flachen, sterilen, durchsichtigen Plastiksachtel liegend transportiert, so daß die Kultur auch in nicht steriler Umgebung ohne Kontaminationsgefahr betrachtet werden konnte.

Die Inkubation erfolgt bei 37°C . Bei Wachstumsversuchen wurde nach einer Stunde, wenn die Mehrzahl der Zellen angehaftet war, das Medium entfernt und die Zahl der nicht angehafteten Zellen bestimmt. Somit konnte die initiale Zellzahl recht genau bestimmt werden.

Bei Versuchen zum Betriebsstoffwechsel erfolgte die Inkubation bis zur Zellkonfluenz entweder im Rahmen (rahmeninkubierte Kulturen) oder in der Kalorimeterkammer (kammerinkubierte Kulturen). Bei rahmeninkubierten Kulturen wurde alle 24 Stunden, bei kammerinkubierten Kulturen alle 48 Stunden das Medium erneuert. Ein größeres Zeitintervall bei letzteren war möglich, da das Medium hier 16 ml gegenüber 7 ml bei rahmeninkubierten Kulturen beträgt.

Zum Überführen der Folie in die Kammer wurde das Medium abgesaugt, die Folie aus dem Rahmen genommen, leicht gerollt und in die leere, sterile Kammer geschoben. Dabei war die mit Zellen belegte folienfläche nach innen gerichtet. Es wurden 16 ml KM dazugegeben, so daß die gesamte

Folie in Medium getaucht war.

In eine zweite Kammer wurden eine leere, unbehandelte Folie sowie 16 ml KM gegeben. Nach dem Verschrauben wurden beide Kammern bei 37 °C vorthermostatisiert.

Versuche mit Microbeads:

Die Vorteile einer Suspensionskultur können auch mit normalen diploiden Zellen genutzt werden, wenn die Zellen an kleine Sephadex-Kugeln, sog. Microbeads oder Micro-carrier, anhaften und sie sich mit diesen wie eine Suspension verhalten (van Wezel, 1973). Laut Broschüre zum Micro-carrier Cytodex 1 sollen auch Vorhautfibroblasten des Menschen mit dieser Methode erfolgreich kultiviert werden können.

0,1 g Cytodex 1 in 5 ml PBS-Lösung wurden 15 Minuten lang autoklaviert. Der Überstand wurde dekantiert und die beads in 5 ml KM aufgenommen. Dann wurden 10 ml einer Fibroblastensuspension von $5 \cdot 10^5$ Zellen/ml KM hinzugegeben und das Volumen mit KM auf 25 ml aufgefüllt. Schwaches Rühren der Kultur verhinderte das Sedimentieren der beads. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C.

Durch Probenentnahme, Trypsinieren der Probe mit einer HBSS-Trypsin-Lösung, Filtrieren der Suspension über einen Millipore-Filter (Porengröße 100 μ m) und Bestimmen der Zellzahl pro bead wurde das Wachsen der Kultur verfolgt. Alle 24 Stunden erfolgte ein Wechsel des Mediums.

Für flow-kalorimetrische Versuche wurde die Kultur eingesetzt, wenn sich die Zellzahl pro bead von ursprünglich 10:1 auf ca. 50:1 erhöht hatte, d.h. wenn pro ml ca. 10^6 Fibroblasten vorlagen.

0,1 g Cytodex entspricht einer Oberfläche von 600 cm^2 und bietet ca. $2,2 \cdot 10^8$ Zellen Platz. Da 0,1 g Cytodex auch ca. $5,6 \cdot 10^5$ beads entsprechen, bedeutet dies, daß Konfluenz erst vorliegt, wenn ca. 390 Zellen pro bead auftreten. Bei einer Belegdichte von 50 Fibroblasten pro bead zu Versuchsbeginn lassen sich somit $(390 - 50) \cdot 5,6 \cdot 10^5 = 1,9 \cdot 10^8$ Zellteilungen bis zum Erreichen der Konfluenz erfassen.

Versuche mit Glasgefäßen:

Für die manometrischen Untersuchungen nach Warburg wurden unbehandelte, sterile Glasgefäße benutzt. In jedes Gefäß wurden $5 \cdot 10^5$ Zellen in 3 ml KM pipettiert. Nach einigen Stunden wurde das Inkubationsmedium verworfen und neues KM (3 ml) ermöglichte den Zellen die Ausbildung eines Monolayers. Zur Messung gelangten nur Gefäße, deren Zellen seit mindestens 24 Stunden in der stationären Phase waren.

Bei jeder Versuchsserie wurden 11 Gefäße gleichzeitig eingesetzt, davon waren 10 Gefäße mit Zellen beschickt. Das 11. Gefäß enthielt lediglich KM und diente als Thermobarometer. Alle Gefäße wurden unmittelbar vor Versuchsbeginn mit neuem KM (3 ml) versehen. Zusätzlich wurde bei 5 Gefäßen 0,3 ml 20 %ige KOH in die Ansatzbirne pipettiert. Ein Stück Filterpapier sollte die CO_2 -Absorption erhöhen. Die mit Aluminiumfolie umwickelten Gefäße wurden an die Manometer angeschlossen und bei 37°C 30 Minuten temperiert.

Zur Anthralinapplikation wurden alle 11 Gefäße der Apparatur entnommen, das alte Medium gegen neues anthralinhaltiges ausgetauscht und nach einer halbstündigen Temperierzeit die Messung fortgeführt.

Am Ende des Versuchs wurden die Zellzahl und das Ver-

hältnis toter zu lebender Zellen bestimmt.

Versuche mit Plastikgefäßen:

Für Untersuchungen im Batch-Kalorimeter, im Warburg-Gerät mit der Sauerstoffelektrode sowie bei Bestimmungen der Glukose- bzw. Laktatkonzentration des Mediums wurden Plastik- kulturröhrchen mit einem inneren Durchmesser von 13 mm und einem äußeren Durchmesser von 15 mm benutzt.

Die Warburg-Messungen erfolgten in den Originalgefäßen. Der Manometerschliff und die Öffnung der Plastikgefäße stimmten so gut überein, daß die Kontaktstellen mit etwas Hochvakuumfett eingeschmiert nach außen dicht abschlossen. Die Originalgefäße wurden ebenfalls bei der Bestimmung der Metabolitkonzentrationen eingesetzt.

Auf eine Gesamtlänge von 7 cm wurden die Originalgefäße verkürzt, damit sie in die Kalorimeterkammern paßten. Diese verkürzten Gefäße wurden in einigen Versuchen im Anschluß an die kalorimetrische Messung noch für manometrische Untersuchungen benutzt.

Für polarographische Versuche wurden aus den Original- gefäßen 4 cm lange Röhrchen herausgeschnitten und an Stelle der herkömmlichen Glasröhrchen in die Sauerstoffelektrode eingepaßt.

In Tab. 2 sind die Anzuchtbedingungen der Röhrchenkulturen angegeben.

Tab. 2: Aufgetragene Zellzahl und Kulturvolumen bei Anzucht

Gefäß	Zellzahl/ 10^6	Kulturvolumen/ml KM
Originalgefäß	3,0	7,0
verkürztes Gefäß	2,0	4,0
Röhrchen	1,3	2,5

Die Originalgefäße wurden mit den dafür vorgesehenen Schraubverschlüssen, die verkürzten Gefäße und die Röhrchen mit Parafilm verschlossen.

Bis zum Erreichen der Zellkonfluenz wurden die Gefäße bei 37 °C mit Hilfe eines kleinen Elektromotors um ihre Längsachse gedreht. Der umdrehungskonstante Motor (0,5 Umdrehungen/Minute) erlaubte die gleichmäßige Ausbildung eines Monolayers unter Überwiegend aeroben Bedingungen. Alle 24 Stunden wurde das KM gewechselt. Für die Versuche zum Betriebsstoffwechsel wurden nur Kulturen benutzt, die seit 24 Stunden in der stationären Phase waren.

Für Warburgmessungen wurden in die Gefäße eigens dafür hergestellte Einsätze für KOH eingeführt. Die Originalgefäße enthielten während der Messung 11,4 ml KM und die verkürzten Gefäße 7,5 ml KM. Die Gefäße wurden durch Einführen des eingefetteten Manometerschliffs in die Gefäßöffnung mit dem Gerät verbunden. Der Auftrieb der ins Wasserbad getauchten Gefäße verhinderte ein Abgleiten. Die Kulturgefäße wurden mit Aluminiumfolie umwickelt und vor der Messung 30 Minuten im Wasserbad der Apparatur temperiert.

Für kalorimetrische Messungen wurden verkürzte Gefäße mit 8 ml KM versehen, mit Parafilm verschlossen, außen mit Ethanol gereinigt und in die sterilen Kammern gebracht. Zur besseren Wärmeleitung wurden die Kalorimeterkammern mit sterilem Wasser gefüllt, bis der Wasserstand das Niveau im Gefäß erreicht hatte.

Für polarographische Untersuchungen wurde das Inkubationsmedium abgesaugt und die Röhrchen dann in die Sauerstoffelektrode eingesetzt. Da beim Einbau des Röhrchens

nicht immer steril vorgegangen werden konnte, wurde die Versuchszeit auf ca. drei Stunden begrenzt. Jede Messung erfolgte mit neuem, durch kräftiges Schütteln mit Sauerstoff angereichertem Medium (5,2 ml).

In Tab. 3 (S. 26) werden die Kulturbedingungen der unterschiedlichen Techniken einander gegenübergestellt.

2.3.2. Versuche mit Hefen

Zur Versuchsvorbereitung wurden die Hefen zweimal in PP gewaschen und anschließend die Zelldichte mit einer Bürker-Türk-Kammer bestimmt. Durch Verdünnen mit dem für den Versuch erforderlichen Medium wurde der Titer auf 10^6 bzw. 10^7 Hefen/ml eingestellt.

Für Versuche im Batch-Kalorimeter wurde die Referenzkammer mit 16 ml VM gefüllt, während die Meßkammer 16 ml einer Hefesuspension in VM enthielt. Für flow-kalorimetrische und polarographische Untersuchungen wurden eine Hefesuspension von 25 ml in einem 150 ml Erlenmeyerkolben angesetzt. Manometrische Messungen erfolgten mit Glasgefäßen, die 3 ml einer Hefesuspension von 10^7 Zellen/ml enthielten.

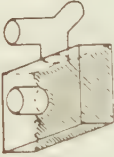
2.4. Geräte und Versuchsdurchführung

2.4.1. Untersuchungen im Batch-Kalorimeter

Das Mikrokalorimeter "Bioflux":

Die batch-kalorimetrischen Untersuchungen wurden in einem Bioflux-Kalorimeter (Thermanalyse, Grenoble, Frankreich) durchgeführt. Es handelt sich dabei um ein Differentialkalorimeter mit zwei Stahlkammern zu 18 ml Volumen.

Ohne thermische Effekte in einer der beiden Kammern wird

Art der Kultur	Plastik-folie	Plastik-verkürztes Gefäß	Original-Plastikgefäß	Glas-gefäß	Plastik-röhrchen	Micro-beads	Kulturflasche
Gerät	Batch-Kalorimeter	Batch-Kalorimeter und Warburg-Apparat	Warburg-Apparat	Warburg-Apparat	Sauerstoff-elektrode	flow-Kalorimeter	---
							
Volumen (cm ³)	18,0 16,0 2,0	10,4 7,5 - 8,0 2,9 - 2,4	14,4 11,4 3,0	16,0 - 20,0 3,0 13,0 - 17,0	5,3 5,2 0,1	ca. 120 25 ca. 95	250 15 235
Kulturfläche (cm ²)	27,0	24,5	36,8	ca. 10	16,3	0,1 g: 600	75
Inokulum (10 ⁶ /ml)	3,0	2,0	3,0	0,5	1,3	5,0	1,0

Tab. 3: Kulturvolumen während der Messung bzw. Anzucht, Kulturfläche und aufgetragene Zellzahl zur Anzucht des Monolayers für die benutzten Gefäße

kein Wärme fluß gemessen. So bald aber Wärmeeffekte (Erwärmung oder Abkühlung) in einer Kammer auftreten, besteht zwischen den Thermoelementen der beiden Kammerführungen eine Spannungsdifferenz, die einem Wärme fluß proportional ist. Thermische Störungen von außen wirken bei diesem Meßprinzip sowohl auf die Meßkammer als auch auf die Referenzkammer und kompensieren sich somit weitestgehend.

Zur besseren Isolierung wurde das Gerät zusätzlich mit sechs dicken Korkringen umgeben. Um die Korkringe war darüber hinaus ein Schlauch gewickelt, der als Temperierschlang e diente. Da die Temperaturkonstanz des Kalorimeters trotz allem unbefriedigend war, mußte das Gerät außerdem in eine 1 cm dickwandige Styroporkiste plaziert werden.

Im Anhang Teil II werden die Kalorimetereich ung, die Temperaturkonstanz des Raums und der Temperatureinfluß auf die Nulllinie beschrieben.

Die Heizung des Kalorimeters erfolgte über ein Temperatursteu gerät (Régulateur de température, Typ RC, Thermanalyse). Die Kalibrierung des Geräts ergab eine Empfindlichkeit von $60,7 \mu\text{V/mW}$. Das Signal wurde mit einem Zwei-Kanal-Schreiber aufgezeichnet.

Außerhalb des Kalorimeters wurden die Kammern in einem Vorthermostaten während 30 Minuten bei 37°C temperiert. Vor dem Plazieren in die endgültige Meßposition erfolgte eine zweite ca. 20minütige Temperierung im oberen Teil der Kammerführung.

Versuchsdurchführung - Fibroblasten:

Alle Untersuchungen an Fibroblasten fanden bei 37°C statt, wobei die Temperierschlang e mit 33°C warmem Wasser durch-

Während der Aufzeichnung wurden die Kammern gelegentlich dem Gerät entnommen, um die Folie zu betrachten oder das Medium zu erneuern. Je nach der zu untersuchenden Fragestellung wurde dann neues pharmakonfreies oder pharmakonhaltiges Medium für nur kurze Zeit oder für den gesamten weiteren Verlauf der anschließenden Messung in der Kammer belassen.

Zur Bestimmung der Wärmeabgabe unter verschiedenen Bedingungen wurde in einigen Versuchen während 15 Minuten reiner Stickstoff bzw. Luft durch die Kultur geperlt. Alle Manipulationen erfolgten aseptisch in der Clean-bench.

Versuchsdurchführung - Hefen:

Die Messungen fanden bei einer Kalorimetertemperatur von 30 °C statt. Die Umgebungstemperatur des Kalorimeters wurde mit der Temperierschlange bei 28 °C gehalten.

Da die Hefen in Suspension kultiviert wurden, war es nicht möglich, das Medium während des Versuchs zu erneuern. Mit der Erschöpfung des Energiesubstrats oder der Anreicherung giftiger Stoffwechselprodukte im Medium mußte es deshalb zwangsläufig zum Ende der Teilungsaktivitäten kommen.

2.4.2. Untersuchungen im Flow-Kalorimeter

Das LKB-10700-1-Flow-Kalorimeter besitzt eine Mix- und eine Durchflußkammer, die beide in einem lufttemperierten Gehäuse untergebracht sind. In dieser Arbeit wurde lediglich die Durchflußkammer benutzt.

Eine Wärmeabgabe in einer der Kammern führt zu einer Temperaturdifferenz zwischen Kammer und Metallblock. Die zwischen Kammer und Metallblock angebrachten Thermolemente

erlauben einen Wärmeaustausch, und über einen Verstärker und einen Schreiber kann die freigesetzte oder aufgenommene Wärme als elektrische Spannung aufgezeichnet werden. Durch eine Wechselschaltung mit der nicht benutzten zweiten Kammer des Geräts werden Außeneinflüsse größtenteils kompensiert.

Das Luftbad wurde über einen externen Vorthermostaten (Colora, Typ WK 5) bei konstanter Temperatur gehalten.

Mit einer peristaltischen Pumpe wurde bei konstanter Pump-rate (20 ml/h) ständig ein Teil der Kultur in die Meßkammer (Volumen: 0,5766 ml) gebracht. Die Pumpe war am hinausführenden Schlauch angeschlossen. Extern wurden Silikon-, intern Teflonschläuche benutzt. Ca. drei Minuten nach der Probenentnahme aus dem Kulturgefäß konnte ein Schreibersignal registriert werden und nach ca. sieben Minuten erreichte die Probe wieder das Gefäß. Die Kalibrierung des Kalorimeters ergab eine Empfindlichkeit von $63,4 \mu\text{V}/\text{mW}$.

Fibroblastenkulturen wurden außerhalb des Geräts in einem Wasserbad von 37°C leicht gerührt. Die Kultivierung der Hefen erfolgte bei 30°C unter starkem Rühren.

Zur Reinigung der Schläuche und der Kammer wurden nacheinander jeweils ca. 5 ml folgender Lösungen benutzt: 0,1 M HCl, 0,1 M NaOH, Eau de javel (Desinfektionsmittel), 96 %iger Ethanol und destilliertes Wasser.

Bei Anthralinapplikationen wurde das Pharmakon direkt in das Medium pipettiert.

2.4.3. Untersuchungen im Warburg-Gerät

Bei manometrischen Messungen werden Druckdifferenzen zwischen dem Gasraum des Reaktionsgefäßes und der Atmosphäre erfaßt. Druckänderungen im Gefäß ergeben sich durch die

Bildung oder den Verbrauch eines Gases, da Volumenänderungen der Organismen vernachlässigbar sind. Änderungen des atmosphärischen Drucks werden mit dem Thermobarometer erfaßt, und um diesen Wert wird die Druckänderung in den Reaktionsgefäßen korrigiert.

Da auch Temperaturschwankungen Änderungen des Drucks nachsichziehen, sind alle Gefäße in ein temperaturkonstantes Wasserbad getaucht.

Die entwickelte oder verbrauchte Gasmenge ergibt sich aus der Druckänderung während eines bestimmten Zeitintervalls und der Gefäßkonstanten. Diese ist ein Faktor, der für das Reaktionssystem (Manometer und Gefäß) sowie für die gewählten Bedingungen (Temperatur, Gasart, Gasvolumen, Flüssigkeitsvolumen, usw.) charakteristisch ist und unabhängig vom eigentlichen Versuch vorher bestimmt werden muß.

Bei Fibroblastenversuchen wurden die Druckänderungen am Manometer alle 20 - 30 Minuten abgelesen und notiert. Auf das Schütteln der Gefäße mußte verzichtet werden, da selbst bei niedrigen Schüttelfrequenzen eine höhere Ablöserate der Zellen beobachtet wurde, als dies spontan bei nicht geschüttelten Kulturen auftritt. Die Auswertung der Meßwerte erfolgte mit Hilfe eines Rechners.

Bei Versuchen mit Hefen wurden ca. alle 10 Minuten die Manometer abgelesen. Starkes Schütteln vermied ein Absinken der Hefen auf den Gefäßboden und erhöhte die Sauerstoffdiffusion ins Medium.

2.4.4. Untersuchungen mit der Sauerstoffelektrode

Für polarographische Messungen an Fibroblasten wurde das Gehäuse sowie die Elektrode einer von der Bachofer GmbH

(Reutlingen) entwickelten Sauerstoffelektroden-Einheit benutzt (Delieu & Walker, 1972). Anstelle des Glasröhrchens, das die eigentliche Reaktionskammer darstellt, wurden bei diesen Untersuchungen eigens dafür hergestellte Plastikröhrchen eingesetzt. Diese wurden aus Plastikkulturgefäßen herausgeschnitten und in das Elektrodengehäuse eingepaßt. Dazu war es nötig, auch den oberen und den unteren Deckel des Gehäuses aus Plexiglas nachzubauen, da die Originalglasröhrchen einen kleineren Durchmesser (1 cm) besitzen als die Plastikgefäße.

Bei Heferversuchen konnte das Originalgefäß benutzt werden.

Spannungsänderungen an der Elektrode wurden über einen Verstärker und einen Schreiber aufgezeichnet.

Die Kalibrierung des Geräts bestand in der Bestimmung einer Luftlinie mit luftgesättigtem Wasser und einer sog. Stickstofflinie, bei der Natriumdithionit mit dem gelösten Sauerstoff reagiert und so eine sauerstofffreie Situation schafft. Die Spannungsdifferenz, bzw. der Abstand zwischen beiden Linien repräsentiert den maximal möglichen Sauerstoffgehalt des Mediums für eine gewählte Temperatur.

Das Gerät wurde täglich kalibriert. Aus dem Spannungsabfall während der Messung wurde der Sauerstoffverbrauch der Zellen errechnet. Um einen ausreichend langen linearen Abfall zu erhalten, konnten die Messungen nur im Abstand von mindestens 20 Minuten erfolgen. Da die Sauerstoffaufnahme atemungsgeschädigter Zellen noch geringer ist, dauerte in diesen Fällen eine Messung bis zu 40 Minuten.

Während bei Fibroblastenversuchen eine einzige Subkultur durch Mediumwechsel 3 - 9 mal untersucht wurde, erfolgte bei Hefen jede Messung mit einer neuen Probe der Subkultur (3 ml).

2.4.5. Untersuchungen zur Laktatbildung und zum Glukoseverbrauch

Für diese Untersuchungen wurden Kulturen in Originalplastikgefäßen anaerob oder aerob kultiviert. Die aerobe Kultivierung erfolgte in rotierenden Gefäßen, während Überwiegend anaerobe Bedingungen in senkrecht ruhenden Gefäßen vorherrschten.

Im Laufe eines Tages wurden stündlich Proben des Mediums entnommen. Nach dem Abzentrifugieren abgelöster Zellen und dem Entweißen des Mediums lagerten die Proben bis zur Bestimmung der Metabolitkonzentrationen im Kühlschrank. Nach jeder Probenentnahme wurde der Kultur ein gleich großes Volumen eines frisch hergestellten Mediums hinzugefügt, so daß sich das Gesamtvolumen während des Versuchs nicht änderte.

2.4.6. Untersuchungen zur Überlebensrate

Zur Bestimmung der Überlebensfähigkeit mußte durch Trypsinieren der Fibroblasten am Versuchsende eine Zellsuspension hergestellt werden. Bei Hefen konnten Proben zur Bestimmung direkt während des Versuchs entnommen werden. Nach dem Versetzen der Probe mit Trypanblau im Verhältnis 6 : 1 färbten sich tote Zellen innerhalb 10 Minuten blau. Dagegen nahmen lebende Zellen den Farbstoff nicht auf.

Durch Auszählen gefärbter und nicht gefärbter Zellen in der Bürker-Türk-Zählkammer wurde die Überlebensrate ermittelt.

3. ERGEBNISSE - UNTERSUCHUNGEN AN FIBROBLASTEN

3.1. Wärmeproduktion einer proliferierenden Kultur

3.1.1. Folienkulturen im Batch-Kalorimeter

Eine wachsende Fibroblastenkultur zeigt ein charakteristisches Wärmeprofil (Abb. 3). Das Thermogramm ist reproduzierbar, wenn die Bedingungen der Vorkultur, insbesondere die anfängliche Zellzahl und die Inkubationszeit die gleichen sind.

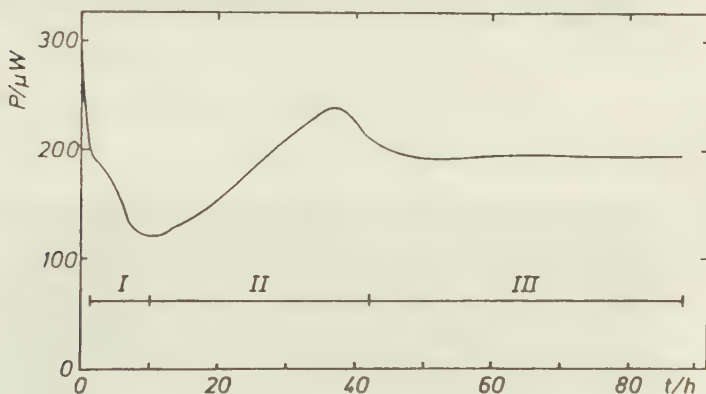


Abb. 3: Thermogramm einer wachsenden in vitro-Kultur dermalen Fibroblasten des Menschen. Beginn der Aufzeichnung: eine Stunde nach dem Beimpfen mit 10^6 Zellen.

Im Thermogramm der Abb. 3 kann man drei Phasen unterscheiden. Nach einem anfänglichen Pik, der Phase I, folgt eine zweite Phase, in der die Wärmeproduktion langsam einem Maximum zustrebt, um dann in der Phase III wieder ein niedrigeres Niveau einzunehmen, das während des weiteren Verlaufs beibehalten wird.

Zur Interpretation des Wärmeprofiles wachsender Kulturen

wurde in einem Parallelversuch eine Kalorimeterkammer unter gleichen Bedingungen mit einer Folie beschickt und die Kultur mehrfach mikroskopisch beobachtet. Gelegentlich wurde auch die Folie, deren Thermogramm gerade aufgezeichnet wurde, entnommen und betrachtet. Das Herausnehmen bzw. Wiedereinführen der Kammern war allerdings jedesmal mit einer ca. halbstündigen thermischen Störung verbunden.

Durch Vergleich mit photographischen Aufnahmen der Zellen einer Parallelkultur läßt sich das Thermogramm einer Fibroblastenkultur folgendermaßen deuten:

Phase I: In dieser Phase werden die gerade angehefteten Zellen breiter und länger und strecken sich schließlich unregelmäßig seitwärts (Abb. 4a).

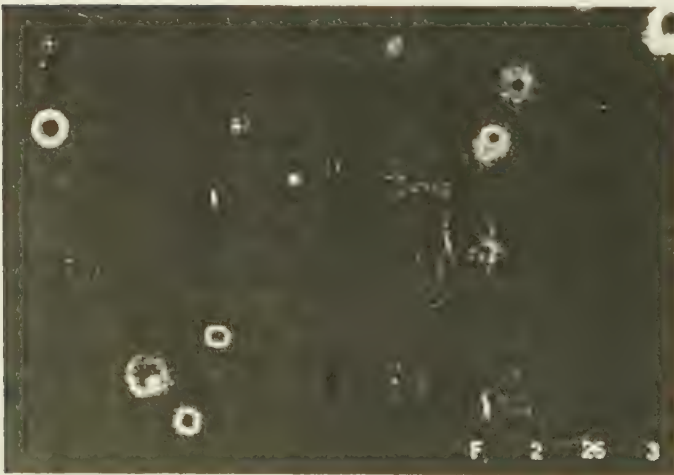


Abb. 4a

Phase II: Die langsame Zunahme der Wärmeproduktion bis zum Erreichen des Maximums geht einher mit der Zunahme der Zellzahl (Abb. 4b).



Abb. 4b

Phase III: Mit Erreichen der Zellkonfluenz (Abb. 4c) fällt die Wärmeproduktion ab, da der Stoffwechsel auf Prozesse beschränkt ist, die der Erhaltung der Kultur dienen. Es wird keine Zunahme der Zelldichte mehr beobachtet.

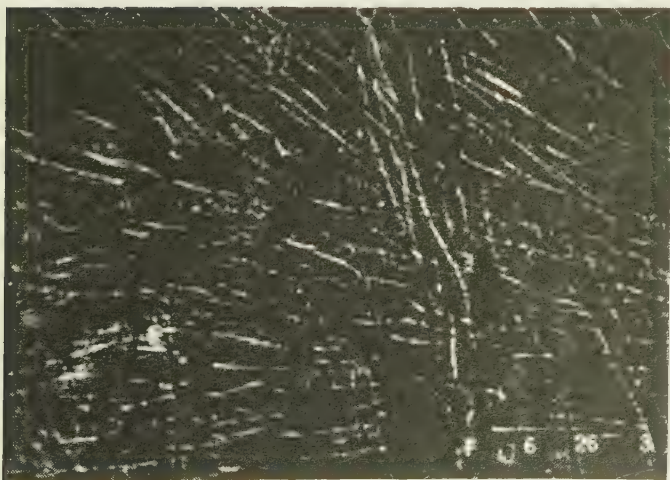


Abb. 4c

Die Abb. 5 gibt zwei Thermogramme von Kulturen wieder, die ebenfalls mit 10^6 Zellen beimpft wurden, deren Wärme-
profil aber erst nach einer 12- bzw. 48stündigen Inkubation
im Rahmen aufgezeichnet wurde. Gegenüber dem Thermogramm

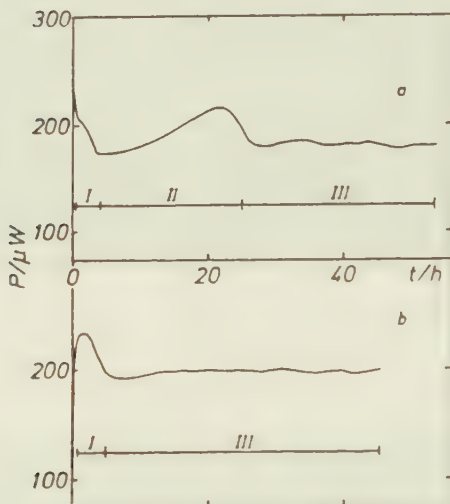


Abb. 5: Thermogramme
zweier Fibroblasten-
kulturen:

- a: Inokulum:
 10^6 Zellen
Inkubation im
Rahmen: 12 Stunden
- b: Inokulum:
 10^6 Zellen
Inkubation im
Rahmen: 48 Stunden

der Abb. 3 ist hier die Phase II verkürzt oder fehlt völlig.

Einen Einfluß auf die Länge der Phase II hat ebenfalls
die Veränderung der anfänglichen Zellzahl zur Folge (Abb.6).

Die Phasen I und III sind unabhängig von der initialen
Zellzahl und der Inkubationszeit, während die Phase II um
so kürzer ist, je größer das Inokulum und je länger die Vor-
kultur der Folie im Rahmen erfolgt.

In einigen wenigen Versuchen wurde proliferierenden Kul-
turen anthralinhaltiges Medium gegeben. Dabei konnten keine
reproduzierbaren Thermogramme gewonnen werden. Es kam zu ab-
rupten Schwankungen der Wärmeproduktion sowie zu ausgepräg-
ten Lag-Phasen.

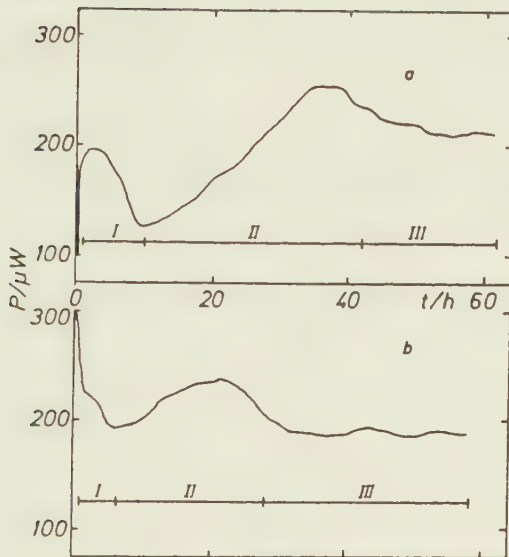


Abb. 6: Thermogramme zweier Fibroblastenkulturen

a: Inokulum: $0,6 \cdot 10^6$ Zellen, zwei Stunden Inkubation im Rahmen

b: Inokulum: $3,5 \cdot 10^6$ Zellen, zwei Stunden Inkubation im Rahmen

3.1.2. Kulturen auf Microbeads im Flow-Kalorimeter

Außerhalb des Kalorimeters wuchsen die Fibroblastenkulturen bei schwachem Rühren bis zu einer maximalen Belegdichte von 190 Zellen/bead. Zellkonfluence wurde nicht erreicht. Sobald diese Kulturen ans Flow-Kalorimeter angeschlossen wurden und durch die Schläuche und die Meßkammer flossen, kam es zu erhöhten Turbulenzen und Friktionen in der Kultur. Fibroblasten lösten sich vom Carrier ab und verstopften nach kurzer Zeit die Zu- und Abflüsse des Kalorimeters. Zahlreiche Zellbruchstücke wurden im Medium gefunden.

3.2. Wärmeproduktion nicht proliferierender Kulturen

3.2.1. Untersuchungen in der stationären Phase - ohne Zugabe von Pharmaka

Ein bedeutender Teil dieser Arbeit ist dem Einfluß von Pharmaka auf den Betriebsstoffwechsel konfluenter Fibroblastenkulturen gewidmet. Deshalb war es notwendig, den Stoffwechsel dieser Phase besonders eingehend zu untersuchen.

Die stationäre Phase (Phase III) ist über mehrere Tage konstant, sofern das Medium regelmäßig alle 24 Stunden erneuert wird (Abb. 7a). Es kommt zu kleineren Schwankungen in der Wärmeproduktion, deren Ursachen aber nicht ergründet wurden. Nach dem Wechsel des Mediums stellt sich wieder das gleiche stationäre Niveau ein. Wenn das Medium alle 48 Stunden gewechselt wird, kann nach ca. 30 Stunden ein allmählicher Abfall der Wärmeproduktion beobachtet werden. Durch den Austausch des alten gegen neues Medium erreicht die Kultur wieder fast das ursprüngliche Wärmeniveau (Abb. 7b).

Wird das Medium erst nach 60 Stunden oder noch später erneuert, zeigt die Kultur eine wesentlich niedrigere Wärmeabgabe als Kulturen, deren Medium täglich gewechselt wurde (Abb. 7c).

PH-Messungen des KM ergaben einen fast unveränderten pH nach einer Kulturdauer von 24 Stunden. Zwei Tage altes Medium war orangefarben und zeigte einen pH-Wert von 6,95.

Trotz konstanter Folienfläche schwankte der Endtiter bei Versuchen, wo das Medium täglich erneuert wurde, zwischen $3,5 \cdot 10^6$ und $4 \cdot 10^6$ Zellen. Dies ergibt eine Zelldichte von $1,08 \cdot 10^5$ bis $1,23 \cdot 10^5$ Zellen/cm².

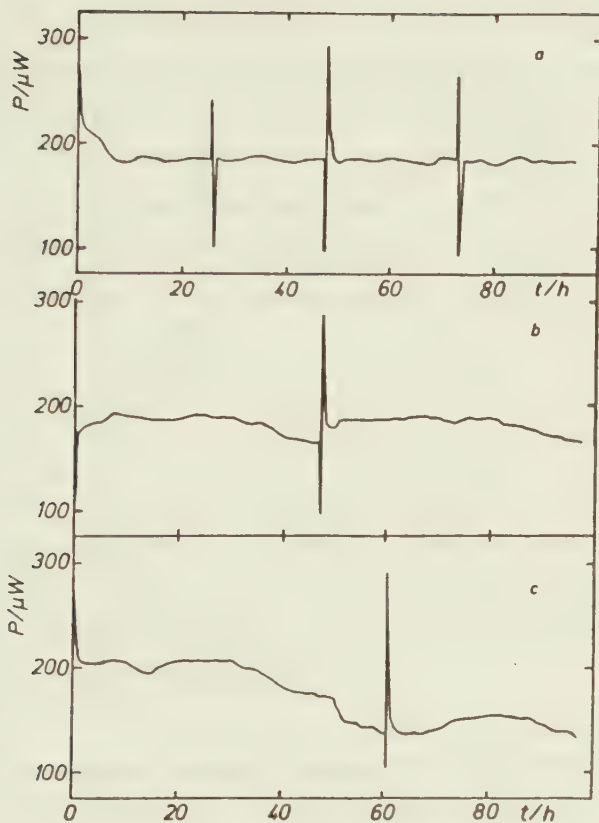


Abb. 7: Wärmeproduktion einer konfluenten Fibroblastenkultur in der stationären Phase
a: Mediumwechsel alle 24 Stunden
b: Mediumwechsel alle 48 Stunden
c: Mediumwechsel nach 60 Stunden

Es konnten keine Unterschiede im Zellendtitert festgestellt werden, wenn die Kulturen aerob im Rahmen oder anaerob in der Kammer zum Monolayer gewachsen sind.

Bei mikroskopischer Betrachtung des Zellrasens eines Monolayers wurden manchmal Stellen auf der Folie beobachtet, die

doppelt belegt zu sein schienen. Die Kultur hatte also über den klassischen Monolayer hinaus stellenweise auch Bilayer vielleicht sogar Trilayer gebildet.

Die Wärmeproduktion der stationären Phase ist der Zellzahl proportional und variiert zwischen $170 \mu\text{W}$ und $210 \mu\text{W}$.

Abb. 8 zeigt die Thermogramme zweier Kulturen, die mit 10^6 Zellen beimpft und 48 Stunden im Rahmen (a) bzw. in der Kammer (b) inkubiert wurden. Nur rahmeninkubierte Kulturen zeigen am Thermogrammanfang ein Maximum. Später erreichen

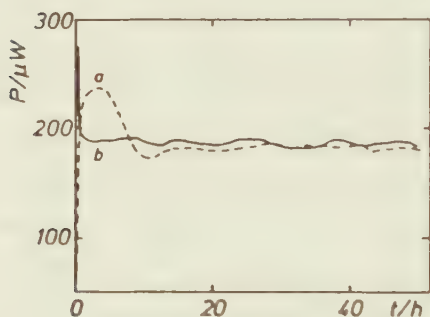


Abb. 8: Thermogramme zweier Fibroblastenkulturen:

a: Rahmeninkubierte Kultur

b: Kammerinkubierte Kultur

beide Kulturen gleiche Niveaus.

Wird eine kammerinkubierte Kultur 24 Stunden nach der ersten Aufzeichnung für 10 Minuten mit sterilem Stickstoff begast und dann mit einer Stickstoffatmosphäre versehen wieder ins Kalorimeter gebracht, liefert die zweite Aufzeichnungsphase das gleiche Wärmeniveau (Abb 9a). Daraus muß geschlossen werden, daß die Fibroblasten unabhängig von den atmosphärischen Bedingungen gleich viel Energie freisetzen. Auch umgekehrte Bedingungen (erst Stickstoff- dann Sauerstoffatmosphäre) zeigen das gleiche Bild (Abb. 9b). Ein Pik, wie er für rahmeninkubierte Kulturen typisch ist, tritt unter diesen Bedingungen erst auf, wenn die Kultur

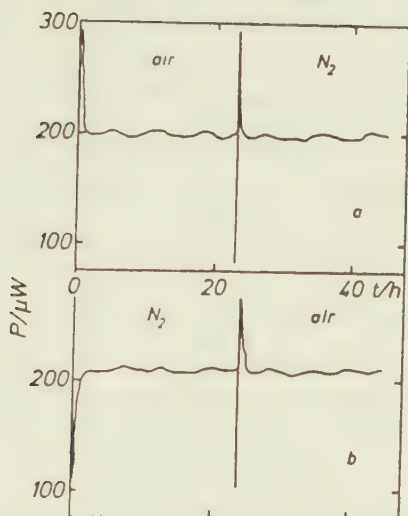


Abb. 9: Thermogramme
zweier kammer-
inkubierter
Fibroblasten-
kulturen:
Einzelheiten s.
Text

zwischenzeitlich nicht nur 10 Minuten, sondern mindestens 6 Stunden mit Sauerstoff begast wurde. Die mehrstündige Zuführung von Sauerstoff beeinflusst also die Wärmeproduktion der Zellen für einen kurzen Zeitraum.

In fünf Versuchen wurden verkürzte Plastikgefäße benutzt, um die Wärmeproduktion konfluenter Fibroblastenkulturen kalorimetrisch aufzuzeichnen. Nach Abklingen der thermischen Störung, die sich durch das Einführen der Kammern und der Adaptation an die Kalorimetertemperatur ergab, wurde über ca. 20 Stunden eine konstante Wärmeentwicklung beobachtet. Diese variierte zwischen $70 \mu\text{W}$ und $120 \mu\text{W}$. Aus der durchschnittlichen Zellzahl von $2,8 \cdot 10^6$ Zellen/Gefäß ergibt sich deshalb eine Wärmeproduktionsrate von $34 \pm 9 \text{ pW/Zelle}$. Im Unterschied zu den Folienkulturen zeigen die Thermogramme hier wesentlich weniger Schwankungen.

3.2.2. Untersuchungen in der stationären Phase - nach Zugabe von Anthralin

Anthralinkonzentrationen, die kleiner als $2\ \mu\text{M}$ sind, zeigen keinen Einfluß auf die Wärmeproduktion konfluenter Fibroblastenkulturen (Abb. 10). Eine Hemmung der Leistung

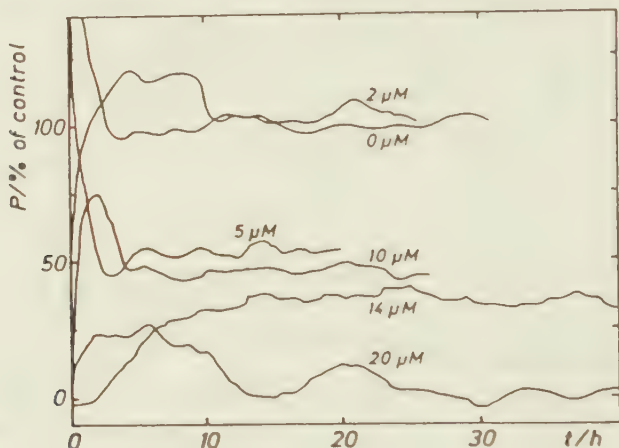


Abb. 10: Thermogramme konfluenter Fibroblastenkulturen nach der Anthralinapplikation in der stationären Phase

um 50 % wird mit einem Medium erreicht, das $7\ \mu\text{M}$ Anthralin enthält. Die verringerte Leistung der Zellen ist bereits zwei Stunden nach der Anthralinzugabe registrierbar, und sie bleibt über ca. 24 Stunden annähernd konstant. Nur hohe Konzentrationen des Pharmakons zeigen stärkere Schwankungen in der Wärmeabgabe.

Wurden die Hautzellen für eine begrenzte Zeit mit einem $10\ \mu\text{M}$ Anthralinmedium behandelt, dann gewaschen und mit anthralinfreiem Medium versetzt, ergibt sich bereits nach zehn Sekunden Applikation eine Verminderung der Wärmepro-

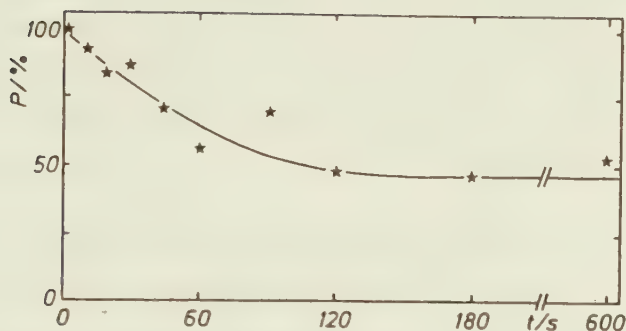


Abb. 11: Verminderung der Wärmeabgabe konfluenter Fibroblastenkulturen nach kurzzeitiger Einwirkung von Anthralin ($10 \mu\text{M}$)

duktion (Abb. 11). Applikationszeiten von 2 Minuten und länger zeigen die gleiche Verringerung der Leistung, wie die permanente Behandlung der Kultur mit einer ebenso hohen Anthralindosis.

Wenn eine Kultur zweimal mit Anthralin behandelt wurde (Abb. 12), konnte auch zweimal eine Hemmung der Wärmeabgabe

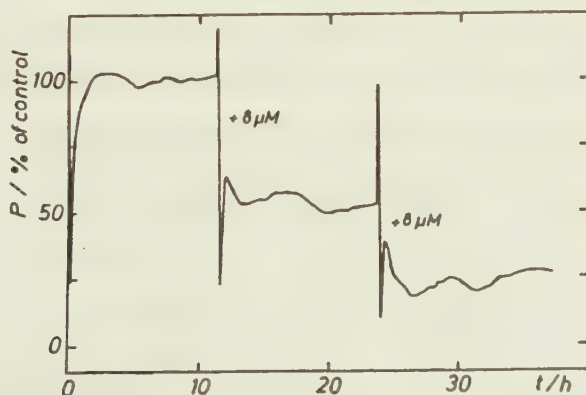


Abb. 12: Hemmung der Wärmeabgabe einer Kultur durch zwei Applikationen von Anthralin

beobachtet werden. Dabei entspricht der Gesamteffekt zweier Applikationen mit $8\text{ }\mu\text{M}$ Anthralin ungefähr der Hemmwirkung, die auch von einer einzigen Dosis von $16\text{ }\mu\text{M}$ verursacht wird. Ähnliche Beobachtungen wurden auch für andere Konzentrationen gemacht.

3.2.3. Untersuchungen in der stationären Phase - nach Zugabe von Anthralinderivaten

In den folgenden Versuchen wurden die in Abb. 1 angegebenen Pharmaka untersucht. Durch Benutzung kammerinkubierter Kulturen kam es nicht zur Ausbildung einer Adaptationsphase, sondern es stellte sich bereits nach ca. einer Stunde ein stationäres Niveau ein. Diese Niveaus zeigten vergleichbare Schwankungen, wie sie auch von Versuchen mit Anthralin her bekannt sind.

Nicht für alle Folien wurde auch die Wärmeproduktion vor der Zugabe des Pharmakons gemessen. Es zeigte sich, daß zur Bestimmung der prozentualen Hemmung auch die mittlere Wärmeproduktion von $191\text{ }\mu\text{W/Kultur}$ zugrunde gelegt werden konnte.

In Abb. 13 werden der Einfluß von Anthralin und vier

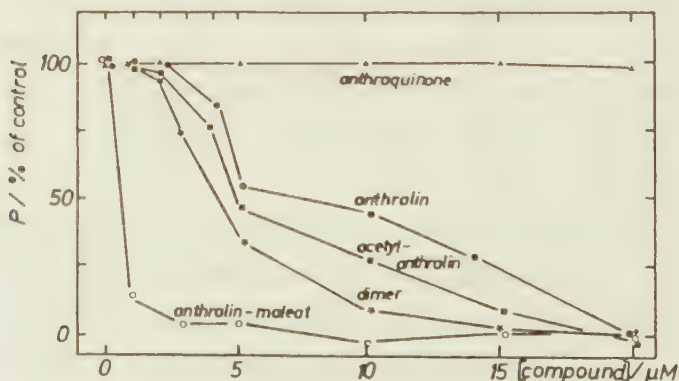


Abb. 13: Hemmung der Wärmeabgabe durch verschiedene Pharmaka

seiner Derivate auf die Wärmeabgabe von Fibroblasten dargestellt. Die Pharmaka wurden in der stationären Phase hinzugegeben und die resultierende Wärmeproduktion 24 Stunden nach Zugabe des Pharmakons mit der Wärmeabgabe vor deren Zugabe verglichen.

Anthraquinon zeigt bis zu Konzentrationen von $20 \mu\text{M}$ keine Verringerung der Wärmeproduktion. Das Acetylderivat und das Dimer hemmen stärker als Anthralin selbst. Als ein äußerst wirksames Pharmakon erweist sich das Anthralinmaleat, das bei einer Konzentration von $0,8 \mu\text{M}$ die Stoffwechselleistung um 50 % hemmt (Tab. 4).

Tab. 4: Wirkstoffkonzentrationen $K_{0,5}$, die zu halbstationärer Stoffwechselaktivität führen.

Pharmakon	$K_{0,5}/\mu\text{M}$
Anthraquinon	60
Anthralin	7
Acetylanthralin	5
Anthralindimer	4
Anthralinmaleat	1

3.3. Sauerstoffverbrauch nicht proliferierender Kulturen

3.3.1. Polarographische Untersuchungen mit der Sauerstoffelektrode

Abb. 14 zeigt die Schreiberaufzeichnung für drei Messungen. Ebenfalls angegeben sind das Niveau für die O_2 -Sättigung sowie die N_2 -Linie.

Da kalorimetrische Versuche gezeigt haben, daß die Anthralinwirkung schon kurze Zeit nach Zugabe des Pharmakons

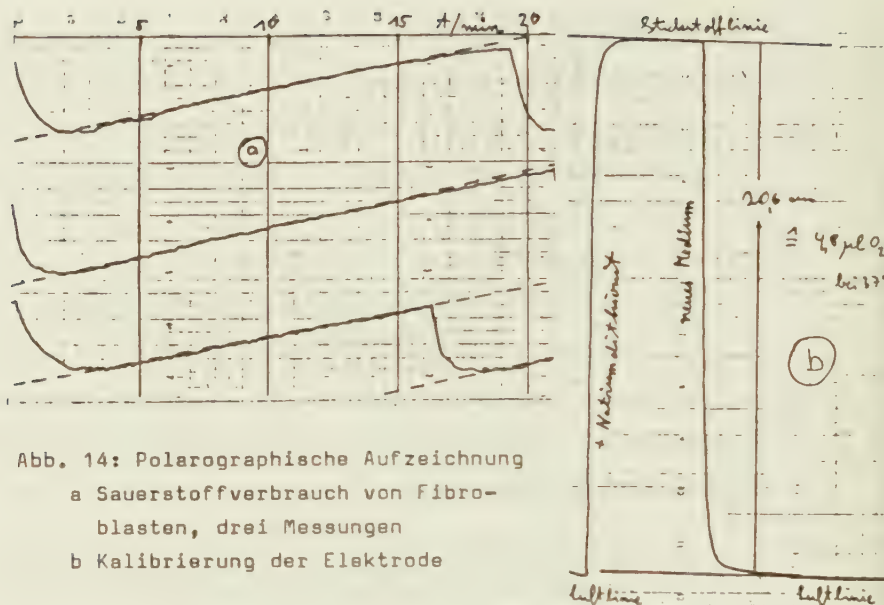


Abb. 14: Polarographische Aufzeichnung
 a Sauerstoffverbrauch von Fibroblasten, drei Messungen
 b Kalibrierung der Elektrode

auftritt, konnte die Versuchszeit auf 3 Stunden beschränkt werden und sterile Arbeitsbedingungen waren nicht erforderlich. Es kam nur zu ganz geringfügigem Bakterienwuchs (5 Bakterien/100 Fibroblasten), da das Medium für jede Messung erneuert wurde.

Der mittlere Sauerstoffverbrauch eines Fibroblasten liegt bei polarographischen Messungen bei $2,12 \pm 0,18 \text{ fl/s}$ (Abb. 15).

Wird in der stationären Phase ein anthralinhaltiges Medium zur Kultur gegeben, bewirkt dies eine sofortige Verringerung des Sauerstoffverbrauchs. Bei Konzentrationen ab $3 \mu\text{M}$ ging die Atmungsaktivität während der Versuchszeit auf Null zurück.

Um den Einfluß des Alters eines anthralinhaltigen Mediums auf den Sauerstoffverbrauch zu untersuchen, wurde ein KM, das $1 \mu\text{M}$ Anthralin enthielt, erst 2 Minuten nach seiner

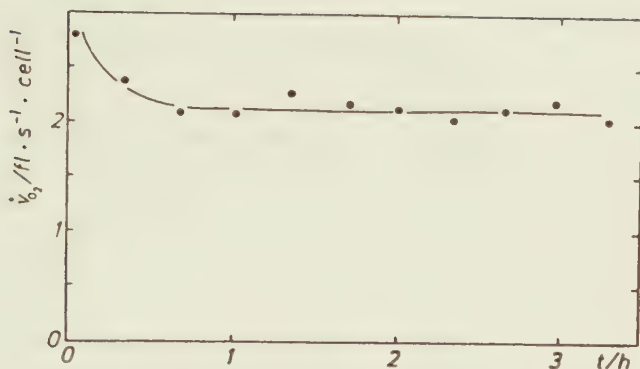


Abb. 15: Polarographisch ermittelter Sauerstoffverbrauch einer Kultur konfluenter Fibroblasten

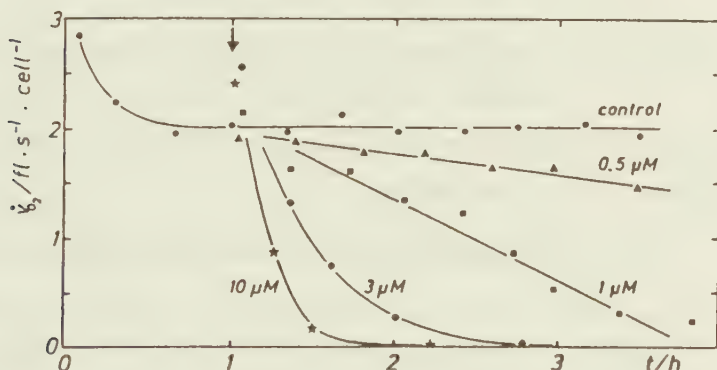


Abb. 16: Hemmung des Sauerstoffverbrauchs von Fibroblasten nach Zugabe von Anthralin

Herstellung zu den Fibroblasten gegeben. Die Hemmwirkung ist gegenüber einer frisch hergestellten Anthralinlösung leicht verringert (Abb. 17). Wenn das Medium 2 Minuten lang einer ersten Fibroblastenkultur ausgesetzt war, wird der Sauerstoffverbrauch der 2. Population nicht mehr gehemmt. Offensichtlich hebt der 2minütige Anthralinkontakt mit den Zellen

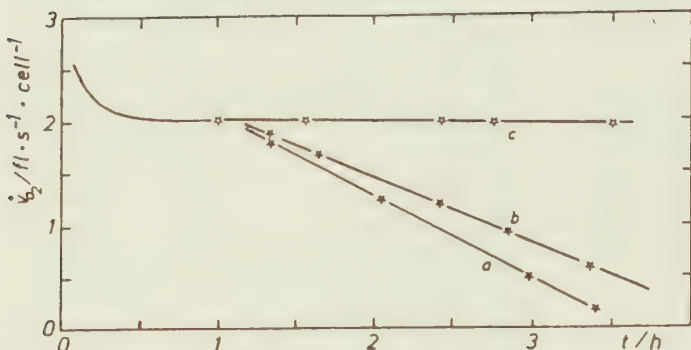


Abb. 17: Hemmung des Sauerstoffverbrauchs von Fibroblasten nach Zugabe von Anthralin ($1\mu\text{M}$)
a: frisch hergestellte Anthralinlösung,
b: 2 Minuten alte Anthralinlösung,
c: Anthralinlösung mit 2minütigem Zellkontakt,
Einzelheiten s. Text

den Effekt auf, nicht aber der 2minütige Kontakt mit Bestandteilen des Mediums.

3.3.2. Manometrische Untersuchungen mit Glasgefäßen

Konfluente Fibroblastenkulturen zeigen bei Warburgmessungen unter Luftbedingungen eine anfänglich erhöhte, aber nach 2 Stunden konstante Sauerstoffverbrauchsrate von $1,82 \pm 0,51$ fl/s · Zelle. Anthralinkonzentrationen von $1\mu\text{M}$ verringern die Atmungsaktivität der Zellen bereits um 50 % (Abb. 18). Im Gegensatz zu polarographischen Untersuchungen führen auch höhere Konzentrationen ($3\mu\text{M}$ bis $15\mu\text{M}$) zu keiner völligen Hemmung.

Versuche mit kurzfristiger Anthralinapplikation ergeben ein ähnliches Bild wie entsprechende kalorimetrische Versuche. Nach wenigen Sekunden Einwirkung sind die Zellen in

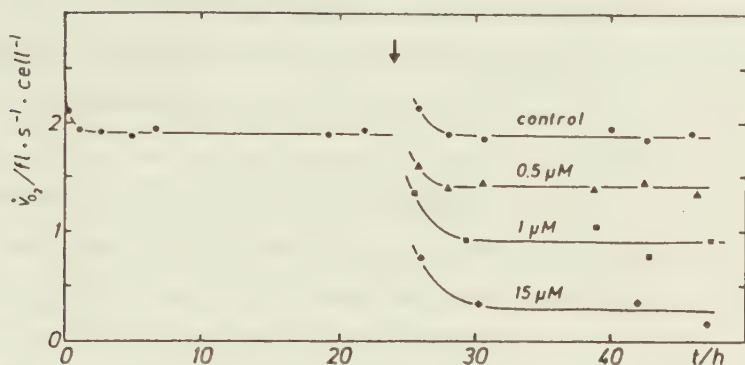


Abb. 18: Hemmung des Sauerstoffverbrauchs von Fibroblasten nach Zugabe von Anthralin (Warburg-Versuche)

ihrer Atmung irreversibel geschädigt und nach einer Behandlung von 2 Minuten ist die Schädigung maximal.

In reiner Sauerstoffatmosphäre beträgt die Verbrauchsrate $2,02 \pm 0,47 \text{ fl/s} \cdot \text{Zelle}$. Nach Anthralingabe ist die Atmungs-
hemmung hier weitaus stärker (Abb. 19). Es stellt sich kein

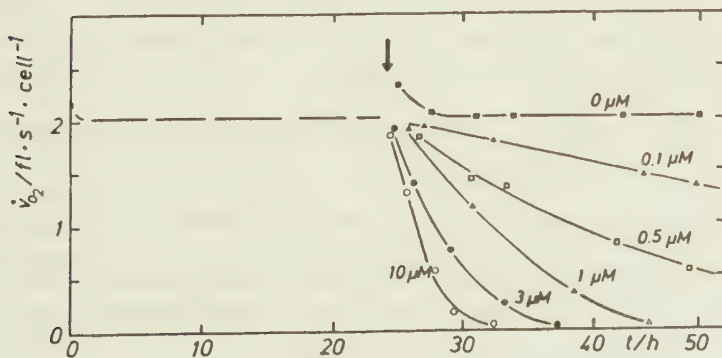


Abb. 19: Hemmung des Sauerstoffverbrauchs von Fibroblasten nach Zugabe von Anthralin (Warburg-Versuche mit Sauerstoffatmosphäre)

konstanter Wert ein, sondern - ähnlich den polarographischen Befunden - nimmt der Sauerstoffverbrauch stetig ab.

3.3.3. Manometrische Untersuchungen mit Plastikgefäßen

Aus 12 Einzelmessungen mit Originalgefäßen ergibt sich eine mittlere Sauerstoffverbrauchsrate von $0,18 \text{ fl/s} \cdot \text{Zelle}$. Das sind 10 % des Verbrauchs, wie er unter aeroben Bedingungen gefunden wird. Schon geringe Anthralinkonzentrationen ($2 \mu\text{M}$) führen zu einem Sauerstoffverbrauch, der an der Nachweisgrenze der Methode liegt.

Im Anschluß an die kalorimetrische Messung und auch parallel dazu wurde der Verbrauch in verkürzten Plastikgefäßen bestimmt. Er ist identisch mit dem von Kulturen in den Originalgefäßen und liegt bei $0,19 \text{ fl } O_2/\text{s} \cdot \text{Zelle}$.

3.4. Kohlendioxidbildung und R.Q.-Wert

Die Kohlendioxidbildungsrate dermalter Fibroblasten beträgt in Warburggefäßen unter Luftbedingungen $1,64 \pm 0,59 \text{ fl/s} \cdot \text{Zelle}$. Aus der entsprechenden Rate des Sauerstoffverbrauchs errechnet sich ein R.Q.-Wert von 0,90. Da die Gasaustauschraten mit erheblichen Fehlern behaftet sind, kann der wahre R.Q. durchaus höher oder niedriger liegen.

Werden die beiden anderen Sauerstoffverbrauchsdaten zugrunde gelegt, ergeben sich R.Q.-Werte von 0,81 bzw. 0,77.

Die Hemmung der Kohlendioxidproduktion nach Anthralinzugabe ist identisch mit der Atmungshemmung. Der $K_{0,5}$ -Wert beträgt ungefähr $1 \mu\text{M}$ Anthralin.

In Gefäßen, die mit einer Stickstoffatmosphäre versehen waren, wurde kein Gasaustausch festgestellt.

In Original-Plastikgefäßen und in verkürzten Gefäßen beträgt die Kohlendioxidbildung unbehandelter Kulturen nur 0,12 fl/s · Zelle und weniger als 0,1 fl/s · Zelle für Kulturen, die mit mehr als 2 μ M Anthralin behandelt wurden.

3.5. Laktatbildung und Glukoseverbrauch

Die Laktatbildung und der Glukoseverbrauch hängen von den Kulturbedingungen ab. Unabhängig davon findet man die gesamte verbrauchte Glukose als Laktat wieder (Tab. 5).

Tab. 5: Laktatbildung und Glukoseverbrauch von Fibroblastenkulturen unter verschiedenen Bedingungen in $\left[\frac{\text{amol}}{\text{s} \cdot \text{Zelle}} \right]$

Kultur- bedingung	Original- Plastikgefäß	verkürztes Plastikgefäß	Folie	Original- Plastikgefäß
	Überwiegend anaerob			aerob
gemessene Laktatbildung	332 $\pm$ 38	356 $\pm$ 35	503 $\pm$ 57	76 $\pm$ 21
errechneter Glukose- verbrauch				
Gärung*	166 $\pm$ 19	178 $\pm$ 18	-	38 $\pm$ 11
Atmung●	3	4	-	16
Gesamt	169	182	-	54
gemessener Glukose- verbrauch	149 $\pm$ 20	175 $\pm$ 34	-	36 $\pm$ 12

* errechnet unter der Annahme, daß 2 Mol Laktat aus 1 Mol Glukose entstehen

● errechnet aus den entsprechenden Sauerstoffverbrauchsdaten unter der Annahme, daß 6 Mol Sauerstoff zur Veratmung von 1 Mol Glukose benötigt werden

In Plastikgefäßen wird unter anaeroben Bedingungen ca. 4,5mal mehr Glukose umgesetzt und Laktat gebildet als unter aeroben Bedingungen. Im Laufe von 24 Stunden sinkt die Glukosekonzentration anaerober Kulturen von 5,5 mM auf 0,5 mM (Abb. 20). Der Abfall der Glukosekonzentration ist bei Folienskulturen trotz höherer Zellzahl und höherer Abbaurate weniger stark, da das KM doppelt so groß ist.

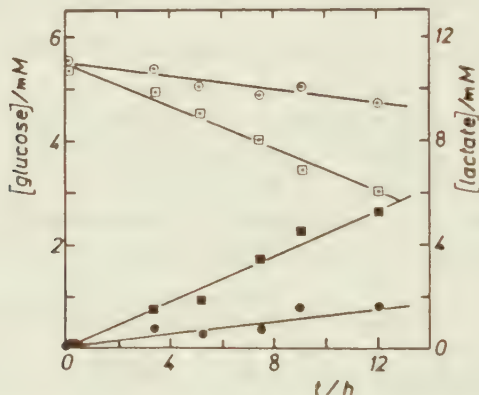


Abb. 20: Abnahme der Glukosekonzentration (offene Symbole), Zunahme der Laktatkonzentration (geschlossene Symbole) bei aeroben (Kreise) und anaeroben (Quadrate) Fibroblastenkulturen in Plastikgefäßen

Tab. 6: Hemmung der Laktatbildung durch Anthralin

Anthralin/ μM	0	1	2	3	4	5	10	15
anaerobe Kultur/ amol/s · Zelle	332	349	383	376	316	195	141	74
aerobe Kultur/ amol/s · Zelle	76	83	74	54	67	34	32	20

Kleine Anthralinkonzentrationen beeinflussen die Laktatbildung nur geringfügig. Höhere Konzentrationen führen zu

zu einer starken Hemmung.

3.6. Überlebensfähigkeit

Am Ende der kalorimetrischen und der manometrischen Versuche wurden die Fibroblasten mit Trypanblau behandelt, um sie auf ihre Anfärbbarkeit zu überprüfen. Nur lebende Zellen sind in der Lage, sich des Einstroms des blauen Farbstoffs in die Zelle zu widersetzen.

Der Einfluß von Anthralin auf die Überlebensrate von Fibroblasten ist in Abb. 21 dargestellt. Die Zelltötung ist

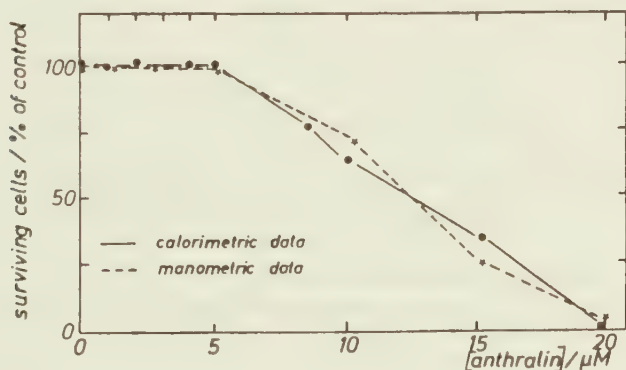


Abb. 21: Abhängigkeit der Überlebensfähigkeit von Fibroblasten von der Anthralinkonzentration 24 Stunden nach Versuchsbeginn

unabhängig von der Kulturtechnik und damit auch unabhängig von der Sauerstoffkonzentration des Mediums. Anthralinkonzentrationen unter $5 \mu\text{M}$ zeigen auch einen Tag nach der Applikation nur geringe Effekte. Bei höheren Konzentrationen besteht ein linearer Zusammenhang zwischen dem cytotoxischen Effekt und der applizierten Dosis.

4.1. Wärmeproduktion proliferierender Kulturen4.1.1. Untersuchungen im Batch-Kalorimeter

Das Thermogramm einer wachsenden Hefepopulation gleicht einer Glockenkurve (Abb. 22). Je höher die Anthralinkonzentration zu Versuchsbeginn ist, umso flacher wird die Kurve.

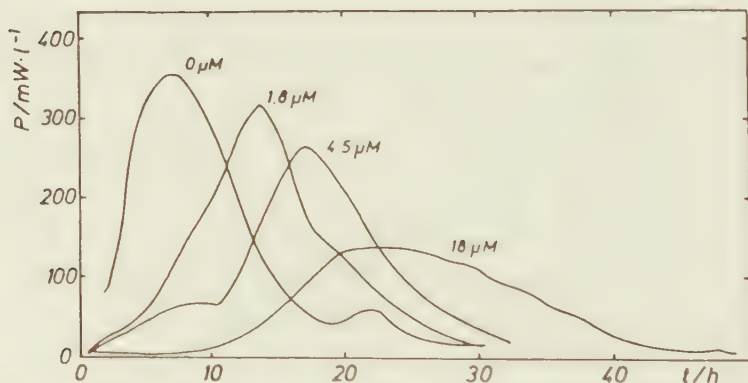


Abb. 22: Thermogramme wachsender Hefekulturen bei verschiedenen Anthralinkonzentrationen, Anfangstiter: 10^6 Zellen/ml

Ein Kurvenvergleich zeigt, daß sich der Zellendtitel sowie die Wärmeabgabe pro Liter Medium mit zunehmender Anthralinkonzentration erniedrigen, während sich der Prozentsatz toter Zellen zu Versuchsende sowie die Wärmeabgabe pro Zellteilung erhöhen (Tab. 7).

In einigen Versuchen wurden auch Hefekulturen mit einem Anfangstiter von 10^7 Zellen/ml untersucht (Abb. 23). Mit höheren Konzentrationen des Pharmakons werden die Thermogramme ebenfalls flacher. Ausgeprägt ist ein anfängliches

Tab. 7: Vergleich der Thermogramme der Abbildungen 22 (a) und 23 (b) bezüglich der Zellzahl zu Versuchsende N_E , des Prozentsatzes toter Zellen zu Versuchsende D_E/N_E , der Energieabgabe pro Liter Medium Q und der Wärmeabgabe pro Zellteilung q .

Anthralin-konzentration		N_E $10^7/\text{ml}$	D_E/N_E %	Q kJ/l	q 10^{-7} J
a	0 μM	3,1	0,5	13,8	4,5
	1,8 μM	2,6	1,9	13,1	5,24
	4,5 μM	2,4	7,5	12,1	5,26
	18,0 μM	0,9	26,0	9,9	12,4
b	0 μM	4,9	0,2	8,6	2,2
	18 μM	4,7	4,0	8,4	2,3
	36 μM	2,9	8,6	7,8	4,2
	45 μM	2,3	14,6	7,5	4,8

Nebenmaximum. Vergleicht man die Thermogramme der Abbildungen 22 und 23 so scheint Anthralin auf das größere Inokulum

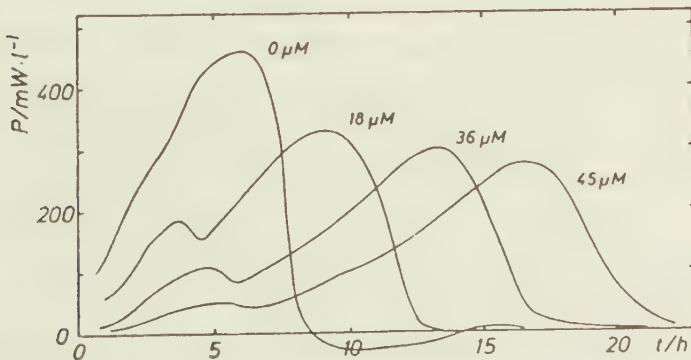


Abb. 23: Thermogramme wachsender Hefekulturen bei verschiedenen Anthralinkonzentrationen, Anfangstitier: 10^7 Zellen/ml

geringere Effekte auszuüben. Die Endtiter liegen höher, während der Prozentsatz toter Hefen, die Energieabgabe/l Medium und die Wärmeabgabe/Zellteilung niedriger sind (Tab. 7).

4.1.2. Untersuchungen im Flow-Kalorimeter

Die Thermogramme flow-kalorimetrischer Untersuchungen unterscheiden sich von denen batch-kalorimetrischer Versuche. Vier der fünf Thermogramme der Abb. 24 zeigen dasselbe charakteristische Profil und scheinen nur ein zeitverschobenes Maximum zu besitzen.

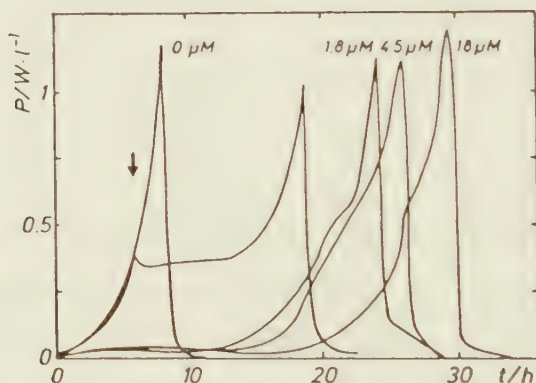


Abb. 24: Thermogramme wachsender Hefekulturen bei verschiedenen Anthralinkonzentrationen, Anfangstiter: 10^6 Zellen/ml; einmal wurde Anthralin ($18 \mu\text{M}$) erst während der Aufzeichnung dazugegeben (↓)

Die Zugabe von Anthralin verlängert die Lag-Phase, hat aber keinen Einfluß auf die maximale Wärmeproduktion, die in allen Fällen bei ca. $1,2 \text{ W/l}$ liegt. Der Zellendtitel beträgt immer $10^8 - 1,2 \cdot 10^8$ Hefen/ml. Er wird aber erst mehrere Stunden nach dem Leistungsmaximum der Kultur erreicht. Im Leistungsmaximum liegt der Zelltitel bei ca. $5,3 \cdot 10^7$ Hefen/ml.

In Abb. 25 werden die Wärmeproduktion P , der Sauerstoffverbrauch $\dot{v}_{O_2}$ und der Zelltiter N einer wachsenden, unbehandelten Kultur angegeben. Drei Stunden nach Versuchsbeginn erreicht die Kultur ihre höchste Sauerstoffverbrauchsrate ($0,92 \text{ fl/s} \cdot \text{Hefe}$). Obwohl die Hefen im Kulturgefäß mit

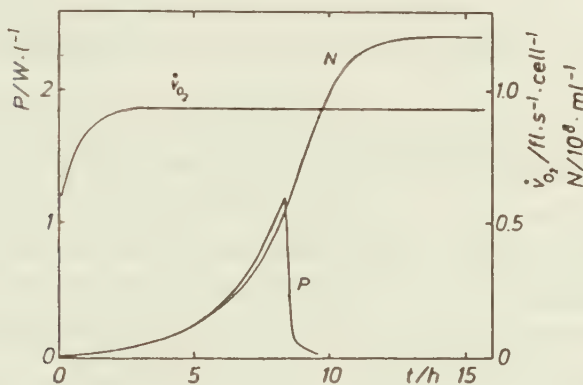


Abb. 25: Sauerstoffverbrauch $\dot{v}_{O_2}$, Wärmeabgabe P und Zellzahl N einer flow-kalorimetrisch untersuchten Hefekultur ohne Anthralinapplikation.

konstanter Rate weiter atmen und sich der Zelltiter weiter erhöht, wird nach ca. 8 Stunden keine Wärmetönung mehr gemessen. Es muß deshalb davon ausgegangen werden, daß der gesamte gelöste Sauerstoff veratmet wird, bevor die Zellen die Meßkammer erreichen.

Aus der mittleren Verweilzeit der Hefen in der Kalorimeterzuführung von 100 Sekunden, der Atmungsrate von $0,92 \text{ fl/s} \cdot \text{Zelle}$ sowie der Zellzahl von $5,3 \cdot 10^7$ Hefen/ml errechnet sich eine Sauerstoffkonzentration von

$$100 \text{ s} \cdot 0,92 \text{ fl/s} \cdot \text{Hefe} \cdot 5,3 \cdot 10^7 \text{ Hefen/ml} = 4,88 \mu\text{l } O_2/\text{ml}$$

in der gerührten Kultur zum Zeitpunkt der Probenentnahme. Dieser Wert liegt etwas niedriger als der theoretische von $5,15 \mu\text{l O}_2/\text{ml}$ für eine sauerstoffgesättigte Kultur bei 30°C unter optimalen Rührbedingungen. Es kommt zum Sauerstoffmangel und die Probe ist nicht mehr repräsentativ für die Kultur, wenn der Titer $5,3 \cdot 10^7$ Hefen/ml überschreitet.

4.2. Wärmeproduktion nicht proliferierender Kulturen

Wenn Hefen exogenen Glukosestoffwechsel in 5 mM-GPP oder 100 mM-GPP betreiben, unterscheiden sich die Thermogramme der flow-kalorimetrischen Untersuchungen nicht, solange die Kulturen kein Anthralin erhalten. Die Wärmeentwicklung der stationären Phase beträgt in beiden Fällen 27 pW/Zelle .

Anthralin hemmt die Wärmeentwicklung ruhender Hefen. Bei niedriger Glukosekonzentration verläuft die Hemmung stärker als bei hoher Konzentration (Abb. 26 und Abb. 27). Eine hohe Glukosekonzentration scheint die Hefen zumindest vorläufig gegenüber der Anthralinwirkung zu schützen.

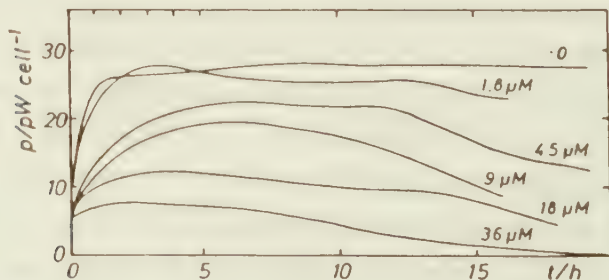


Abb. 26: Hemmung der Wärmeproduktion einer ruhenden Hefekultur in 100 mM-GPP durch verschiedene Anthralinkonzentrationen, Untersuchungen im Flow-Kalorimeter

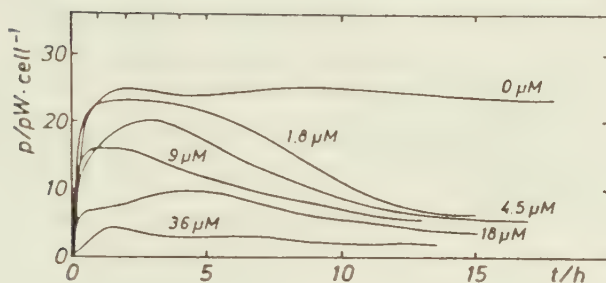


Abb. 27: Hemmung der Wärmeproduktion einer ruhenden Hefekultur in 5 mM-GPP durch verschiedene Anthralinkonzentrationen, Untersuchungen im Flow-Kalorimeter

Wenn Anthralin während des Versuchs zur Kultur gegeben wird, kommt es unmittelbar zu einer Verringerung der Zellleistung. Diese ist bei Versuchen in 100 mM-GPP unabhängig vom Zeitpunkt der Zugabe und erreicht in der Regel ähnliches Ausmaß wie in Kulturen, die Anthralin seit Versuchsbeginn enthalten (Abb. 28).

In 5 mM-GPP wird ebenfalls eine sofortige Hemmung der Wärmeproduktion beobachtet. Der für diese Glukosekonzentration charakteristische Abfall der Energieabgabe tritt aber erst

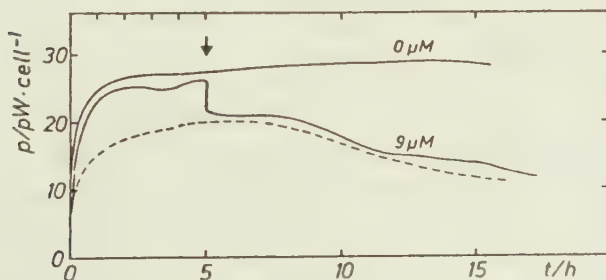


Abb. 28: Hemmung der Wärmeabgabe von Hefen in 100 mM-GPP nach Anthralinzugabe (↓) während des Versuchs, gestrichelt: Anthralinzugabe (9 μM) zu Versuchsbeginn

um einige Stunden zeitverschoben auf (Abb. 29).

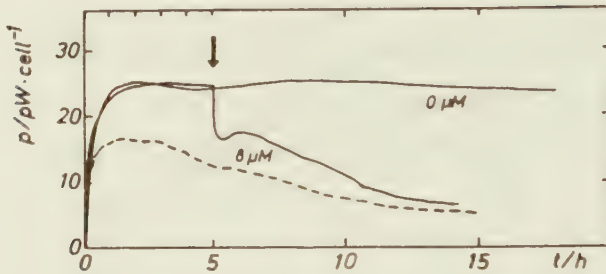


Abb. 29: Hemmung der Wärmeabgabe von Hefen in 5 mM-GPP nach Anthralinzugabe ($\downarrow$) während des Versuchs

Wenn eine Kultur in 100 mM-GPP zweimal mit Anthralin behandelt wird, so addieren sich die Effekte der einzelnen Applikationen zu einem Gesamteffekt, wie er auch ausgelöst wird, wenn die Kultur nur einmal aber mit einer entsprechend höheren Dosis behandelt wird (Abb. 30). Zwei Anthralindosen von 8 μM lösen ungefähr die gleiche Hemmung aus wie eine einzige Gabe von 16 μM .

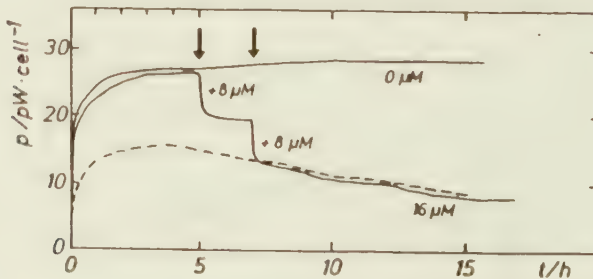


Abb. 30: Hemmung der Wärmeabgabe von Hefen durch 2 Anthralingaben à 8 μM bzw. eine Anthralingabe à 16 μM , gestrichelt: Anthralingabe (16 μM) zu Versuchsbeginn

4.3. Flow-kalorimetrische Untersuchungen zur Anthralin-stabilität und -aufnahme

Um die Anthralinstabilität in wässrigem Milieu zu untersuchen, wurde Anthralin 1, 5, 15, 30 und 60 Minuten vor den Hefen ins Medium gegeben. Die anschließend aufgezeichneten Thermogramme für eine Konzentration von $18 \mu\text{M}$ in 100 mM-GPP zeigen keine Differenzen (Abb. 31).

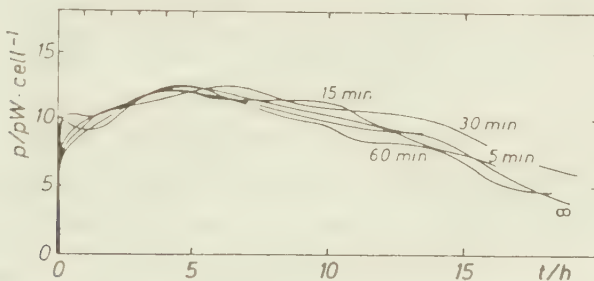


Abb. 31: Hemmung der Wärmeentwicklung von Hefen durch verschieden alte anthralinhaltige Medien ($18 \mu\text{M}$)

Stabilitätsfragen treten vor allem dann in den Hintergrund, wenn gezeigt werden kann, daß Anthralin sehr schnell aufgenommen wird.

In einigen Versuchen wurde deshalb die Kultur nach der Anthralinexposition ($18 \mu\text{M}$) filtriert, gewaschen und mit neuem, anthralinfreiem Medium versetzt. Wenige Sekunden Applikation reichen, um eine irreversible Hemmung der Wärmeabgabe zu verursachen (Abb. 32). Nach einer Minute ist die Wirkung bereits maximal.

Wenn Anthralin an spezifische Rezeptoren der Zellwand bindet oder durch den Kontakt mit Hefen inaktiviert wird, sollte

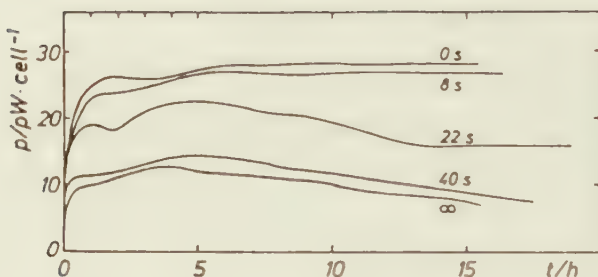


Abb. 32: Hemmung der Wärmeproduktion von Hefen durch Anthralin ($18 \mu M$), das verschieden lange appliziert wurde; Versuche in 100 mM-GPP

das Medium bei einer zweiten Hefepopulation keine Effekte auslösen. Tatsächlich ergeben Versuche, daß ein Medium, das ursprünglich $18 \mu M$ Anthralin enthielt und nur ca. 30 Sekunden einer ersten Kultur ausgesetzt war, die Wärmeproduktion einer zweiten Kultur nicht mehr beeinflussen kann (Abb. 33).

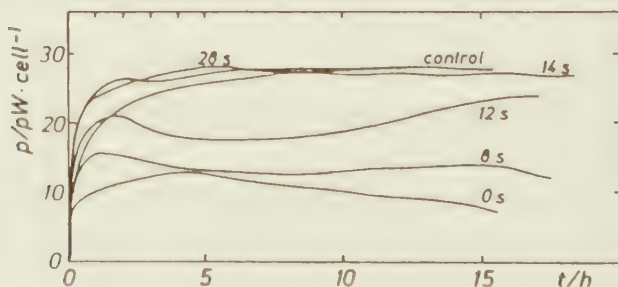


Abb. 33: Hemmung der Wärmeproduktion einer zweiten Hefepopulation (10^7 Hefen/ml) durch ein Medium, das ursprünglich $18 \mu M$ Anthralin enthielt und verschieden lange einer ersten Hefekultur ausgesetzt war

4.4. Sauerstoffverbrauch nicht proliferierender Kulturen

4.4.1. Untersuchungen mit der Sauerstoffelektrode

Die polarographisch ermittelten Sauerstoffverbrauchsra-
ten von Hefen sowie die daraus errechneten Wärmeproduktions-
raten (Tab. 8) zeigen, daß unter aeroben Bedingungen in Ge-
genwart einer hohen Kohlenhydratkonzentration die Zellatmung
zurückgedrängt ist. 39 % bzw 52 % der kalorimetrisch be-

Tab. 8: Sauerstoffverbrauchsrate $\dot{v}_{O_2}$, errechnete Wärmepro-
duktionsrate p_S und Atmungsanteil der Wärmeabgabe
 p_S/p_K von Hefen während des Betriebsstoffwechsels
unter verschiedenen Glukosebedingungen.

Glukose- konzentration mM	$\dot{v}_{O_2}$ fl/s·Zelle	p_S pW/Zelle	$\frac{p_{\text{Sauerstoffelektrode}}}{p_{\text{Kalorimeter}}}$ %
100	0,5	10,5	39
5	0,67	14,1	52

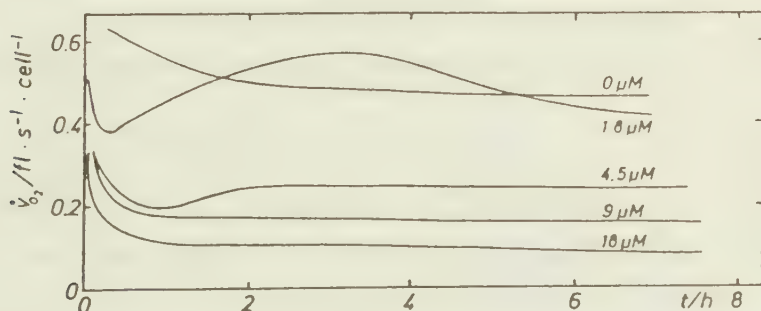


Abb. 34: Einfluß verschiedener Anthralinkonzentrationen auf
den Sauerstoffverbrauch von Hefen während des Be-
triebsstoffwechsels in 100 mM-GPP.

stimmten Wärmeabgabe von 27 pW/Hefe können dem aeroben Glu-
koseabbau zugeschrieben werden.

Die Wirkung von Anthralin auf den Sauerstoffverbrauch von Hefekulturen demonstrieren die Abb. 34 und Abb. 35.

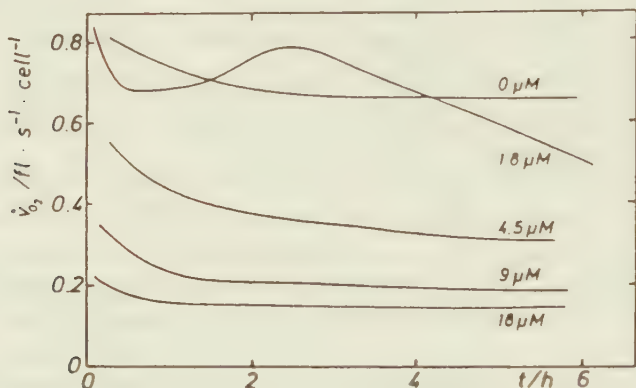


Abb. 35: Einfluß verschiedener Anthralinkonzentrationen auf den Sauerstoffverbrauch von Hefen während des Betriebsstoffwechsels in 5 mM-GPP.

Anthralinkonzentrationen unter $2,5 \mu\text{M}$ stimulieren den Verbrauch kurzfristig. Höhere Konzentrationen führen zu einer irreversiblen Hemmung der Atmung, wobei das Ausmaß der Hemmung unabhängig von der Glukosekonzentration ist (Abb. 36). Eine Konzentration von $5 \mu\text{M}$ hemmt die Atmung um 50 %.

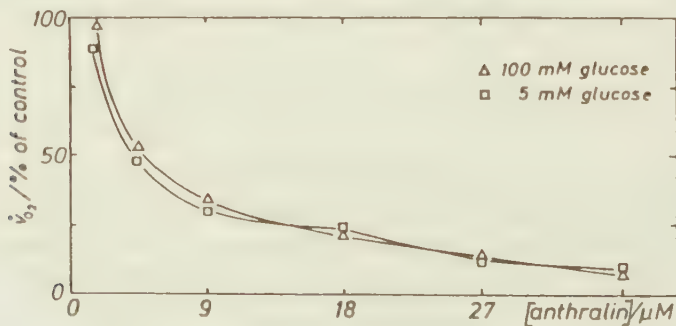


Abb. 36: Verbleibende Atmungsaktivität 6 Stunden nach der Anthralinapplikation

Anthralingaben während des Versuchs zeigen eine sofortige Verringerung der Sauerstoffaufnahme durch Hefen. Der Effekt ist bereits 30 Minuten nach der Anthralingabe maximal (Abb. 37).

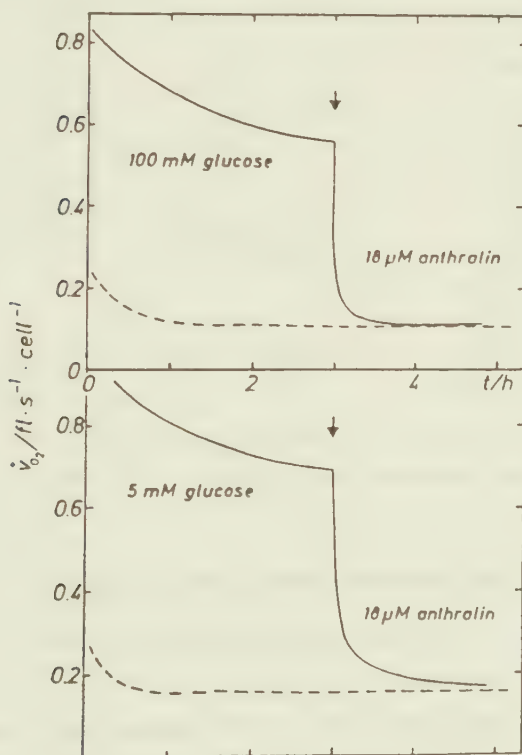


Abb. 37: Hemmung des Sauerstoffverbrauchs von Hefen durch Zugabe von Anthralin während des Versuchs

Entsprechend den kalorimetrischen Versuchen wurde auch mit der Elektrode untersucht, ob Anthralin in wässriger Lösung instabil wird und sich seine Wirkung ändert. Dazu wurde anthralinhaltiger (18 μ M) 100 mM-GPP 3, 5, 15, 30 und 60 Minuten lang bei 30 °C gerührt, bevor die Hefen (10⁷ Zellen/ml) hinzugegeben wurden. Für alle untersuchten Zeiten war die Reduktion des Sauerstoffverbrauchs gleich groß.

In kalorimetrischen Versuchen an wachsenden Hefen wurde bereits ein titerabhängiger Effekt des Anthralins beobachtet. Entsprechende polarographische Versuche zeigen, daß bei höheren Zelltitern nicht wachsender Hefen die Atmungs-
hemmung geringer ist (Abb. 38).

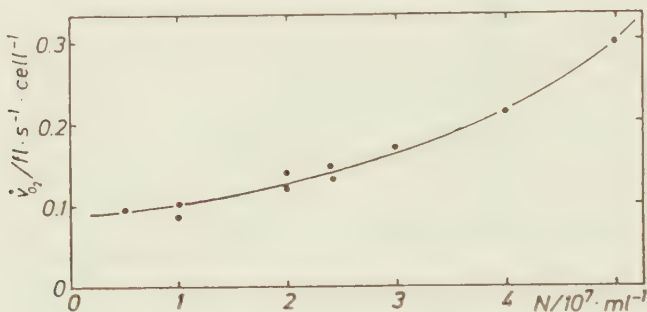


Abb. 38: Abhängigkeit der Wirkung von Anthralin (18 μM) auf den Sauerstoffverbrauch einer Hefekultur vom Zell-titer

4.4.2. Untersuchungen mit dem Warburg-Apparat

Aus 23 Einzelmessungen wurde für Hefen in 100 mM-GPP eine mittlere Sauerstoffverbraucherate von $0,68 \pm 0,05$ fl O_2 pro Sekunde und Zelle bestimmt. Durch Veratmen von Glukose ergibt sich somit eine Wärmeproduktion von 14,3 pW/Hefe. Das entspricht 53 % der kalorimetrisch gemessenen Wärmeabgabe.

Die Anthralinwirkung auf die Zellatmung wird in Tab. 9 zusammengefaßt. Die absoluten Raten für den Sauerstoffverbrauch liegen etwas über den polarographisch ermittelten Werten. Der Prozentsatz der verbleibenden Atmungsaktivität stimmt recht gut mit den polarographischen Angaben überein. Der $K_{0,5}$ -Wert beträgt 5 μM .

Tab. 9: Abhängigkeit des Sauerstoffverbrauchs von Hefen in 100 mM-GPP von der Anthralinkonzentration des Mediums. Messung 6 Stunden nach Versuchsbeginn

Anthralin- konzentration	Sauerstoff- verbrauch	Restatmung Messung im Warburg- Apparat	Restatmung Messung mit Sauerstoff- elektrode
μM	fl/s · Zelle	%	%
0	0,68	100	100
1,8	0,64	94,1	96,4
4,5	0,38	55,9	52,5
9	0,23	33,8	33,9
14,4	0,18	26,5	24,3
18	0,15	22,1	21,4
36	0,05	7,4	7,1
(0)*	0,85	-	-

4.5. Kohlendioxidproduktion nicht proliferierender Kulturen

Die Kohlendioxidproduktion einer nicht wachsenden Hefekultur ist nach ca. 60 Minuten über 30 Stunden konstant. Sie beträgt 6 Stunden nach Versuchsbeginn 1,5 fl CO_2 /s · Zelle in 100 mM-GPP bzw. 0,97 fl CO_2 /s · Zelle in 5 mM-GPP. Dabei sind folgende Anteile auf Gärung und Atmung zurückzuführen:

CO_2 -Gesamtproduktion	in fl/s · Zelle	1,5	(0,97)*
CO_2 -Produktion durch Atmung	in fl/s · Zelle	0,68	(0,85)*
CO_2 -Produktion durch Gärung	in fl/s · Zelle	0,83	(0,12)*

Hefekulturen, die mit Anthralin behandelt wurden, zeigen 6 Stunden nach Versuchsbeginn in dem gemessenen Konzentra-

* für Untersuchungen in 5 mM-GPP

tionsbereich eine erhöhte Kohlendioxidproduktion (Abb. 39). Diese ist einer verstärkten Gärung zuzuschreiben, da der Anteil, der der Atmung entstammt, mit zunehmender Anthralinkonzentration geringer wird. In Gegenwart von $9 \mu\text{M}$ Anthralin ist die Gärungsrate gegenüber einer unbehandelten Kultur fast verdreifacht.

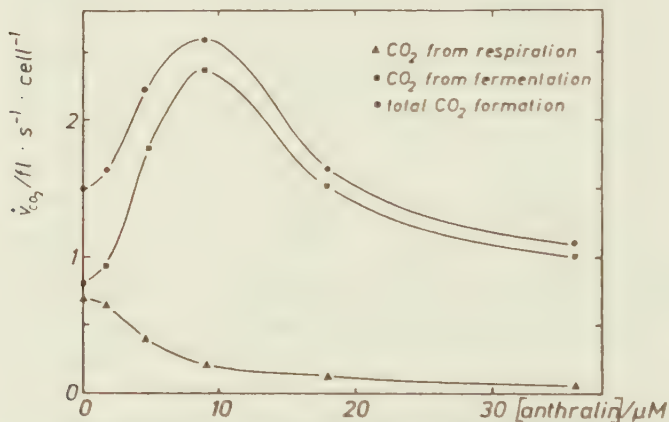


Abb. 39: Abhängigkeit der Kohlendioxidproduktion einer Hefekultur in $100 \mu\text{M}$ -GPP von der Anthralinkonzentration des Mediums; Messung 6 Stunden nach Anthralinzugabe

4.6. Cytotoxische Effekte der Anthralinbehandlung

In Abb. 40 wird der Zellendtitler einer wachsenden Hefepopulation als Maß für die Zellinaktivierung in Abhängigkeit von der Anthralinkonzentration des Mediums dargestellt. Danach sind Kulturen mit kleinem Anfangstiter sensibler als Kulturen mit höherem Anfangstiter.

Eine Kultur, die mit 10^6 Hefen/ml bei $18 \mu\text{M}$ Anthralin gestartet wurde, erreicht 15 Stunden später einen Endtiter,

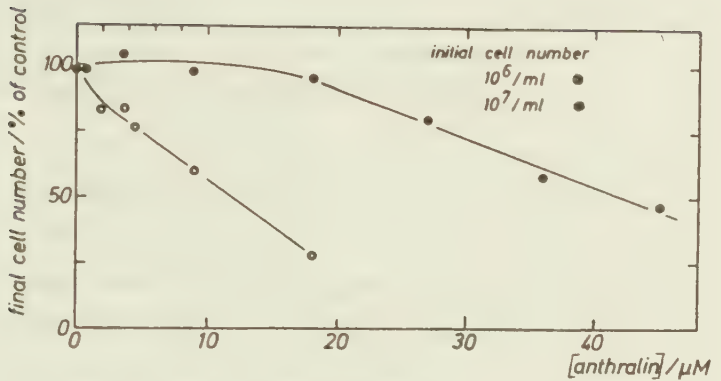


Abb. 40: Abhängigkeit des Zellendtiters wachsender Hefen von der Anthralinkonzentration des Mediums

der bei ca. 27 % einer Kontrollkultur liegt. Unter gleichen Bedingungen ist bei einem Anfangstiter von 10^7 Hefen/ml der Endtiter lediglich 4 % kleiner als der einer Kontrollkultur. $1,9 \cdot 10^6$ Zellen sind tot.

An Hefen wurde insbesondere auch der zeitliche Einfluß von Anthralin auf die Überlebensfähigkeit untersucht (Abb. 41).

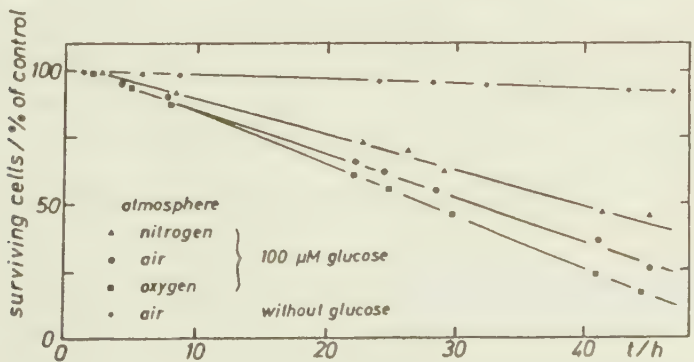


Abb. 41: Abhängigkeit der Überlebensfähigkeit ruhender Hefen von den Kulturbedingungen nach Anthralinbehandlung ($18 \mu\text{M}$)

Entsprechende Untersuchungen an Fibroblasten waren nicht möglich, da zur Bestimmung der Überlebensrate die Zellen trypsiniert und die Versuche zwangsläufig unterbrochen werden müssen.

Bei Hefen sinkt die Chance zum Überleben - auch nach häufigem Waschen der Zellen - mit der Zeit. Hefen, denen Glukose exogen angeboten wird, erfahren eine wesentlich höhere Abtötung als Hefen mit endogenem Stoffwechsel (Abb. 41). Darüberhinaus ist auch eine Inaktivierungsabhängigkeit vom Sauerstoffgehalt der Kultur festzustellen. Unter Stickstoffbedingungen ist die Zelltötung geringer als unter einer Luft- bzw. Sauerstoffatmosphäre.

Ruhende Hefekulturen, die während des exogenen Betriebsstoffwechsels Glukose ausschließlich vergären, haben eine ähnliche Sensibilität gegenüber Anthralin wie wachsende Kulturen unter anaeroben Bedingungen. Bei einem Ausgangstiter von 10^7 Hefen/ml sind 15 Stunden nach der Anthralinzugabe $1,8 \cdot 10^6$ bzw. $1,9 \cdot 10^6$ Hefen durch Trypanblau gefärbt. Nur $3 \cdot 10^5$ von 10^7 Zellen/ml sterben, wenn Hefen mit endogenem Stoffwechsel mit $18 \mu\text{M}$ Anthralin behandelt werden.

5. DISKUSSION

5.1. Wachsende Fibroblastenkulturen

Das Thermogramm einer proliferierenden Fibroblastenkultur ist derart typisch, daß eine Unterteilung in drei Phasen möglich ist (Pätel, 1981).

Nach mikroskopischem Vergleich sollten die drei Phasen folgende Situationen einer Kultur repräsentieren:

Phase I	Ausbreitung und Abflachung der gesäten Zellen
Phase II	Zellmultiplikation mit Baustoffwechsel
Phase III	ruhende Zellen mit Betriebsstoffwechsel

Für die Phasen II und III mag die gegebene Interpretation des Thermogramms allgemein zutreffen, nicht aber für Phase I, da diese auch in Thermogrammen nachgewiesen werden kann, die bereits 12 oder 48 Stunden vor der kalorimetrischen Messung beimpft worden sind (Abb. 5).

In der Abb. 42 wurde versucht, aus dem Thermogramm die exotherme Phase der Zellteilung herauszuheben. Die schraffierte Fläche zwischen Nulllinie und aufgeschriebener Kurve ist die insgesamt abgegebene Wärme während der Zellteilung von 10^6 auf $3,5 \cdot 10^6$ Zellen.

Unter der Annahme, daß die Enthalpieänderung pro neugebildeter Zelle über den gesamten Zeitraum der Phase II dieselbe ist, ergibt sich somit eine Energie von $4,5 \pm 1,6 \mu\text{J}$ pro Zellteilung. Dieser Wert kommt den von Nikolić & Nešković (1976) ermittelten $3,5 \mu\text{J}$ pro Mausfibroblast recht nahe.

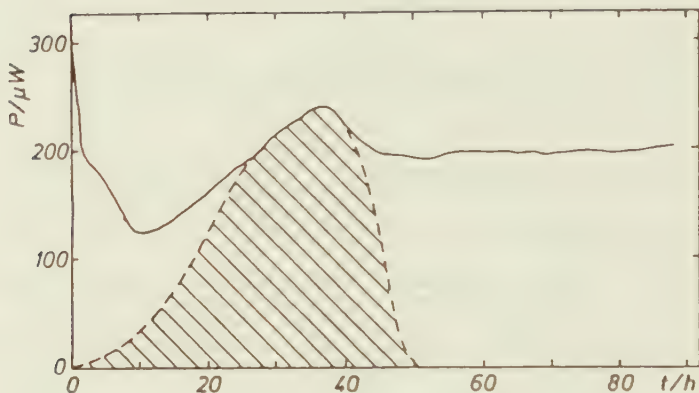


Abb. 42: Thermogramm wachsender Fibroblasten, schraffiert: angenommene Wärmeabgabe während der Zellmultiplikation

Die Wärmeentwicklung einer wachsenden Zelle liegt mit 69 pW nur ca. 35 % über der Wärmeabgabe einer ruhenden Zelle. Diese Beobachtung stimmt gut mit Untersuchungen an Chemostat-Kulturen von Mäusezellen überein, bei denen der Energiebedarf einer Zelle über den gesamten Bereich der untersuchten Verdünnungsraten annähernd konstant ist (Sinclair, 1980). Fibroblasten benötigen zur Vermehrung offensichtlich nur etwas mehr Energie als zur Erhaltung ihrer Strukturen und Funktionen.

Bei den hier durchgeführten Versuchen kommt es aufgrund der limitierten Kulturfläche nach ca. $2 - 3 \cdot 10^6$ Zellteilungen zum Wachstumsstillstand. Die Wachstumsphase ist verkürzt, wenn die Folie zu Versuchsbeginn dichter besät oder die Inkubation über einen längeren Zeitraum außerhalb des Kalorimeters vorgenommen wird.

Daß nicht das Medium wachstumsbegrenzend wirkt, wenn es

täglich gewechselt wird, ergibt sich aus der Beobachtung, daß der Mediumwechsel keine neue Wachstumsphase induziert, sobald sich die Kultur in der stationären Phase befindet.

5.2. Adaptation von Fibroblasten an anaerobe Bedingungen

Kulturen in der Kalorimeterkammer und in senkrecht kultivierten Plastikgefäßen befinden sich unter Überwiegend anaeroben Bedingungen. Die Atmungstätigkeit ist auf ca. 10 % aerober Kulturen verringert.

Wegen der kleinen Austauschfläche Luft/Medium und des langen Diffusionswegs erhält nur ein Teil der Zellen Sauerstoff. Die Mehrzahl der Zellen bekommt keinen Sauerstoff und muß ihren Stoffwechsel auf fermentative Prozesse beschränken. Die Gärungsaktivität gegenüber atmenden Zellen ist um einen Faktor von 4,5 erhöht.

Um die Anwesenheit geringer Sauerstoffmengen in Kulturen der Kalorimeterkammer und senkrecht kultivierter Plastikgefäße zu verdeutlichen, ist in dieser Arbeit häufig von den "Überwiegend anaeroben Bedingungen" die Rede.

Streng anaerobe Bedingungen liegen vor, wenn der Sauerstoff restlos entfernt wurde. Hier zeigen Fibroblasten über 24 Stunden keine Veränderung bezüglich ihrer Zellzahl, ihrer Lebensfähigkeit oder ihrer Wärmeabgabe. Längere Zeiträume wurden nicht untersucht, da ein Mediumwechsel unter anaeroben Bedingungen nur mit verhältnismäßig aufwendigen Mitteln durchzuführen gewesen wäre.

Daß die Phase I mit den Prozessen der Zellvergrößerung, -ausbreitung und -abflachung korreliert sein kann, diese Prozesse aber nicht Ursache einer erhöhten Stoffwechselaktivität

sind, wurde bereits erwähnt. Kulturen, die eine längere Zeit außerhalb einer Kammer inkubiert wurden, zeigen nämlich ebenfalls die Phase I, nicht aber Kulturen, die einen Teil der Inkubationszeit in der Kammer verbracht haben. Dies deutet darauf hin, daß es sich hierbei um eine Adaptation an die Bedingungen der Kammer handelt. In der Tat ist eine rahmen-inkubierte Kultur den gleichgünstigen Bedingungen der Sauerstoffversorgung ausgesetzt wie etwa eine Subkultur im Glasgefäß oder in der Kulturflasche.

Innerhalb weniger Stunden müssen deshalb Folienkulturen, die ins Kalorimeter gebracht werden, ihren Stoffwechsel von Überwiegend aeroben Prozessen im Rahmen auf Überwiegend anaerobe Prozesse in der Kammer umstellen. Daß annähernd anaerobe Bedingungen genauso erfolgreich genutzt werden können, beweist die Tatsache, daß der Zellrasen jeweils gleich schnell wächst.

Eine Kultur, die einmal den Kammerbedingungen angepaßt ist, zeigt keine weitere Adaptationsphase unabhängig davon, ob die Kultur eine Stickstoffatmosphäre erhält (Abb. 9a), kurzzeitig Sauerstoff durchs Medium perlt (Abb. 9b) oder ob nur das Medium gewechselt wird (Abb. 7). Lediglich mehrstündige Begasungen mit Sauerstoff oder ein mindestens 6stündiger Aufenthalt der Folienkultur im Rahmen führen wieder zur Ausbildung einer Adaptationsphase. Offensichtlich genügt dieser Zeitraum, um die Kultur wieder an aerobe Bedingungen anzupassen.

Schaarschmidt & Reichert (1981) gehen davon aus, daß auch eine Kammerkultur, die nicht ständig gerührt und belüftet wird, durch Diffusionsvorgänge ausreichend mit Sauerstoff versorgt wird. Sie kommen zu diesem Schluß, da keine Erhöhung der Wärmeabgabe in der stationären Phase auftritt, wenn das KM nach

Abschrauben des Kammerdeckels vorsichtig gerührt wird. In der Regel dürfte aber der so zugeführte Sauerstoff bereits während des Abklingens des thermischen Störeffekts verbraucht sein.

Sauerstoff ist nicht nur für die Zellatmung unentbehrlich, sondern wird vielmehr als Substrat einiger anabolischer und katabolischer Reaktionen benötigt. Alle Versuche, Säugetierzellen unter streng anaeroben Bedingungen wachsen zu lassen (Gregg, 1972, Merz & Schneider, 1982), führten nach einigen Tagen zum Absterben der Zellen.

Donnelly & Scheffler (1976) beschreiben eine Fibroblastenmutante mit Atmungsdefekt, die ATP ausschließlich über anaerobe Glykolyse synthetisiert. Trotzdem schließen die Autoren aus, daß diese Mutante unter anaeroben Bedingungen wächst.

Da eine von Pouysségur et al. (1980) beschriebene Fibroblastenmutante Glukose nicht glykolytisch, sondern ausschließlich über den HMP-Shunt katabolisiert, scheinen Fibroblasten also weder Atmung noch Gärung für die Zellvermehrung unbedingt zu benötigen. Beide Prozesse können sich ergänzen und scheinen vielmehr die zelluläre Antwort auf herrschende Kulturbedingungen zu sein.

Streng anaerobe Bedingungen ertragen ruhende Fibroblasten sogar über mindestens 24 Stunden, und da die Wärmeproduktion den Kulturen mit Luftatmosphäre entspricht, muß der Gesamtbeitrag von 50 pW/Zelle über anaerobe Glykolyse gewährleistet werden.

5.3. Energiestoffwechsel konfluenter Fibroblastenkulturen

5.3.1. Wärmeproduktion

Die in dieser Arbeit gemessenen Wärmeproduktionsraten von 51 ± 5 pW/Zelle bzw. 34 ± 9 pW/Zelle liegen in der gleichen Größenordnung wie entsprechende Werte anderer Autoren (Tab. 10). Es werden nur Untersuchungen zitiert, in denen ebenfalls die Monolayertechnik benutzt wurde.

Tab. 10: Wärmeproduktionsraten einiger Säugetierzellen in Kultur

Organismus	Wärmeproduktionsrate	Referenz
Maus, Fibroblasten L929	69 pW	Nikolić & Nešković (1976)
Mensch, Hela-Zellen	20 - 40 pW	Ljungholm et al. (1978)
Mensch, Haut-Fibroblasten	40 pW	Schaarschmidt & Reichert (1981)
Mensch, Haut-Fibroblasten	51 pW	diese Arbeit
Mensch, Haut-Fibroblasten	34 pW	diese Arbeit
Hamster, Fibroblasten, Atmungsdefekt	58 pW*	Donnelly & Scheffler (1976)
* aus der Laktatproduktion errechnet		

In der stationären Phase beschränken Fibroblasten ihren Stoffwechsel auf ein Minimum, das zum Überleben und Aufrechterhalten der Funktionen unabdingbar ist. Zellvermehrung unterbleibt, da die zur Verfügung stehende Fläche erschöpft ist.

Da Versuche fehlschlagen, den Betriebsstoffwechsel unter aeroben Bedingungen zu untersuchen, bleibt die Frage offen, ob nicht eine höhere Wärmeabgabe als unter anaeroben Bedingungen möglich wäre. Atmende Zellen haben zwar einen höheren Ordnungsgrad als gärende Zellen, da sie funktionsfähige Mitochondrien benötigen, ihr theoretischer Mehrbedarf an Energie zur Lebenserhaltung dürfte aber klein sein. Sogar der Stoffwechsel wachsender Fibroblasten ist mit 69 pW/Zelle von dem nicht proliferierender Zellen nicht sehr verschieden. Zumindest für dermale Fibroblasten des Menschen scheinen deshalb 40 - 50 pW/Zelle unabhängig vom Atmungs-Gärungs-Anteil typisch zu sein.

Die Unterschiede in den beiden Wärmeproduktionsraten dieser Arbeit liegen sicherlich in den andersartigen Kulturbedingungen begründet und werden unter 5.4. diskutiert.

Durch das Einspannen der Folie im Rahmen kann ein peripherer Bereich von 17 % der Gesamtfläche nicht besät und während der Rahmeninkubation nicht bewachsen werden. Bei rahmeninkubierten Kulturen tragen deshalb auch proliferierende Zellen zu einem gewissen Teil zur Wärmeproduktion der stationären Phase bei.

Die beiden Vorteile kammerinkubierter Kulturen (keine Adaptationsphase, Bewachsen der nicht besäten Fläche während der Inkubation) machen diese Form der Anzucht für Reihenuntersuchungen interessant.

Die gute Korrelation zwischen Zelltitern und Wärmeentwicklung in der stationären Phase ($r = 0,86$) belegt die Genauigkeit der Methode (Abb. 43). Die abweichenden Zelltitern der Einschichtkulturen ($3,5 - 4 \cdot 10^6$ Zellen) können durch gering-

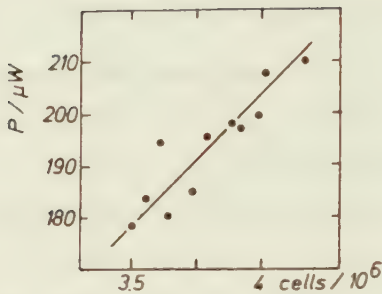


Abb. 43: Abhängigkeit der Wärmeabgabe vom Zelltitert der konfluenten Fibroblastenkultur

fürge Unterschiede bei der Behandlung der Subkulturen bedingt werden. Entscheidende Bedeutung kommt zum Beispiel dem Alter der Kultur zu. Nach Azzarone & Macieira-Coelho (1982) nimmt die maximale Zellzahl mit der Passagenzahl ab.

5.3.2. Sauerstoffverbrauch

Die ersten Manometerablesungen fanden 24 Stunden nach Versuchsbeginn statt, da es am ersten Tag zu erheblichen Adaptationsschwankungen kam. Über ähnliche Streuungen berichten auch Mayer & Sames (1981), die den Sauerstoffverbrauch alternierender Kulturen des Linseneithels manometrisch verfolgten.

Die Meßwerte wurden mit einem Rechner ausgewertet und dann graphisch dargestellt. Typische Ergebnisse zweier Parallelversuche sind in Abb. 44 wiedergegeben. Die Werte der Abb. 44a streuen erheblich und eine Auswertung ohne Regressionsanalyse wäre kaum möglich. Die vom Rechner gefundene Regressionsgerade besitzt eine Steigung (pente = 0,068), die recht gut mit der Steigung der Kurve b (pente = 0,060) übereinstimmt. Messungen an Parallelversuchen, die lediglich über drei Stunden erfolgten, zeigen häufig widersprüchliche Ergebnisse. In dieser Arbeit wurden deshalb bei Fibroblastenversuchen ca. 10 Manometerablesungen (über einen Zeitraum von 5 Stunden) zur Berechnung einer einzigen Sauerstoffverbrauchsrate benutzt.

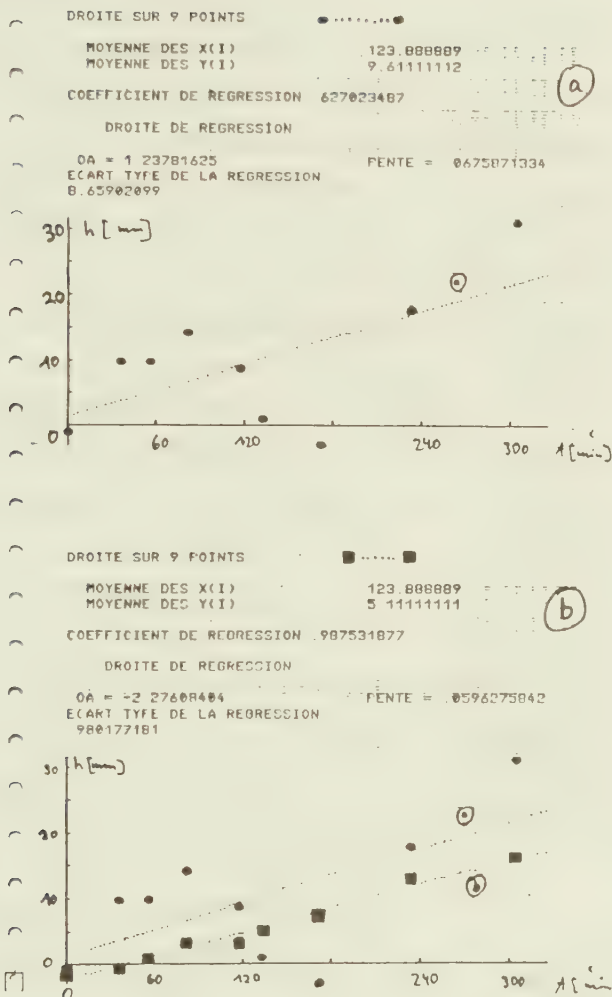


Abb. 44: Regressionsanalyse und graphische Darstellung manometrischer Meßergebnisse zweier Parallelversuche mit Hilfe eines Rechnerprogramms

Der Sauerstoffverbrauch dermalen Fibroblasten des Menschen liegt bei ungefähr 1,8 - 2,1 fl/s · Zelle. Die manometrischen Werte wurden aus 57 bzw. 13 Einzelmessungen ermittelt, deren Unterschiede teilweise 50 % ausmachen.

Polarographische Einzelwerte weichen weniger stark voneinander ab. Dies mag an der dreimal höheren Zellzahl und an der besseren Maßgenauigkeit der Methode liegen.

Die Sauerstoffversorgung der Kultur erfolgt in Warburg-Gefäßen durch Diffusion aus dem Gasraum. Nach Werrlein & Glinos (1974) ist der Abfall des Sauerstoffpartialdrucks bei einer 3 mm hohen Mediumschicht sehr stark von der Zelldichte abhängig. Bei Kulturen transformierter Mäusefibroblasten kann die Sauerstoffkonzentration unmittelbar über der Zelloberfläche auf 60 % des anfänglichen Werts abfallen, wenn die Belegdichte $2,5 \cdot 10^5$ Fibroblasten/cm² beträgt. In der vorliegenden Arbeit lag die Zelldichte meistens wesentlich niedriger (Tab. 11), so daß eine ausreichende Sauerstoffversorgung der Zellen vermutet wird. Die Verbrauchsrate der von Werrlein und Glinos untersuchten Zelllinie L liegt bei 1,5 fl/s Zelle (Sinclair, 1980) und ist von der menschlicher diploider Fibroblasten nicht sehr verschieden (vergl. Tab. 12).

Tab. 11: Zellzahl und Zelldichte für verschiedene Subkulturen

	Folie	Original verkürzt Röhr- chen			Warburg
		Plastikgefäße			
mittlere Zellzahl/ 10 ⁶ Zellen/ml	3,8	4,0	2,8	2,0	0,52
maximale Zellzahl/ 10 ⁶ Zellen/ml	4,0	—	—	—	0,6
maximale Zelldichte/ 10 ⁵ Zellen/cm ²	1,23	1,08	1,12	1,25	0,52

Die verbesserte Sauerstoffdiffusion bei reiner Sauerstoffatmosphäre schlägt sich in einen ca. 10 % höheren Verbrauch der Fibroblasten nieder.

Die Zelldichte beträgt in Warburggefäßen maximal $6 \cdot 10^4$ Zellen/cm² und ist damit nur rund halb so hoch wie bei den anderen Subkulturen (Tab. 11). Offensichtlich gedeihen Fibroblasten auf Glas weniger gut als auf speziell behandelten Materialien.

Tab. 12: Sauerstoffverbrauchsrate $\dot{v}_{O_2}$ einiger Säugetierzellen in Kultur

Zellen	Technik	$\dot{v}_{O_2}$ [fl/s-Zelle]	Referenz
Fibroblasten, L 929	errechnet	1,5	Sinclair, 1980
Fibroblasten, BHK	Polarographie	0,78	Ehrlich et al., 1978
Ehrlich-Ascites Tumor-Zellen	Manometrie	0,89	Schachtschabel & Kuerschner, 1972
Neuroblastomzellen, differenziert	Manometrie	1,36	Ciesielski-Treska et al., 1972
desgleichen, un- differenziert	Manometrie	0,14	desgleichen
Linsenepithel- zellen	Manometrie	5,6	Mayer & Sames, 1981
Fibroblasten, Dermis	Manometrie Luft	1,82	diese Arbeit
desgleichen	Manometrie Sauerstoff	2,02	diese Arbeit
desgleichen	Polarographie	2,12	diese Arbeit

Polarographische Messungen finden an der Sättigungsgrenze für Luft statt. Wegen des ständigen Mediumwechsels sinkt die Sauerstoffkonzentration während der Messung nie unter 75 % der maximalen Sättigung.

Manometrische Untersuchungen erfolgen dagegen bei niedri-

geren Sauerstoffkonzentrationen. Dies mag ein Grund dafür sein, daß manometrische Werte im Mittel kleiner sind als polarographische.

Im folgenden Teil der Arbeit wird bei Berechnungen eine Rate von 2,1 fl/s Zelle für aerobe Bedingungen angenommen.

Ein Vergleich mit anderen in der Literatur bekannten Raten zeigt (Tab. 12), daß trotz unterschiedlichster Zellen, Techniken und Kulturbedingungen die in dieser Arbeit gefundenen Werte in der gleichen Größenordnung liegen.

5.3.3. Kohlendioxidbildung und R.Q.-Werte

Eigene frühere Untersuchungen an in vitro-Kulturen von Fibroblasten haben einen Sauerstoffverbrauch von 1,8 fl/s · Zelle und eine Kohlendioxidproduktion von 3 fl/s · Zelle ergeben (Pätel et al., 1981). Die wesentlich höhere Rate der Kohlendioxidbildung dieser Untersuchung hing mit der kleinen Zahl der Meßwerte und mit Ungenauigkeiten bei der Auswertung (ohne Regressionsanalyse) zusammen.

Auch die Raten dieser Arbeit sowie die errechneten R.Q.-Werte sind nicht sehr zuverlässig. Sie liegen niedriger als es für reine Glukoseveratmung typisch wäre (1,0) und höher als es der Veratmung von Aminosäuren entspräche (0,71).

Neben Glukose enthält das KM noch eine Vielzahl anderer möglicher Atmungssubstrate (Tab. 13). Exogen angebotene Aminosäuren können von Fibroblasten auch aufgenommen und als Energiesubstrat genutzt werden (Finkelstein, 1981, Gazzola et al., 1980, Griffiths & Pit, 1967, Zielke et al., 1978, Donnelly & Scheffler, 1976).

Wegen hoher Unzuverlässigkeit können Fragen zum Intermediärstoffwechsel vom R.Q.-Wert nicht befriedigend beantwortet werden

Tab. 13: Konzentration potentieller Atmungssubstrate im KM

Substrat	Konzentration/mg l ⁻¹
Aminosäuren insgesamt	1559
davon: L-Glutamin	584
L-IsoLeucin	105
L-Leucin	105
L-Leucin HCl	146
L-Threonin	95
Pyruvat	110

5.3.4. Glukoseverbrauch und Laktatbildung

Die theoretische Glukoseoxidation unter Überwiegend anaeroben Bedingungen ist kleiner als die Standardabweichung der Glukoseverbrauchsmessungen. Deshalb unterscheiden sich der theoretische und der gemessene Glukosegesamtverbrauch nicht signifikant (Tab. 5).

Dies gilt nicht für Überwiegend aerobe Kulturen, wo der theoretische Gesamtverbrauch signifikant über dem gemessenen Wert liegt. Zumindest bei aeroben Kulturen kann Glukoseoxidation deshalb nicht Ursache des Sauerstoffverbrauchs sein. Da sich unabhängig von den Kulturbedingungen die Raten für Laktatbildung und Glukoseverbrauch entsprechen, scheinen Fibroblasten Glukose ausschließlich in Laktat umzusetzen und der Sauerstoff muß ein anderes Substrat oxidieren.

Daß die Rolle der Glukose als Atmungssubstrat in den Hintergrund tritt, sobald andere Substrate exogen zur Verfügung stehen, wurde von Montini (1981) an Herzzellen gezeigt. Danach geht der Prozentsatz des Sauerstoffverbrauchs, der zur Glukoseveratmung benötigt wird, von ursprünglich 77 % auf 28 %

und schließlich 7 % zurück, wenn dem Medium zu den 5 mM Glukose noch 1 mM bzw. 7,5 mM Laktat und Palmitat zugesetzt werden.

Nach Donnelly & Scheffler (1976) sind die Glukosefermentation zu 60 % und die Oxidation von Glutamin zu 40 % an der Wärmeabgabe von Fibroblasten des Hamsters beteiligt, während die Glukoseoxidation minimal ist.

Zielke et al. (1978) schätzen den Anteil der Glutaminoxidation am Energiebedarf diploider Fibroblasten des Menschen auf 30 %. Fibroblasten wachsen noch bei 25 μ M Glukose (das sind 0,5 % der üblichen Konzentration) mit normaler Wachstumsrate, da sie ihren Energiebedarf über eine erhöhte Glutaminoxidation decken (Zielke et al., 1978).

Auch die hier vorliegenden Untersuchungen deuten daraufhin, daß nicht Glukose sondern ein anderes Substrat - wahrscheinlich Glutamin - veratmet wird. Glutamin ist nach Glukose das mengenmäßig mit Abstand bedeutendste Substrat des KM. Seine Oxidation zu Kohlendioxid liefert mit 33 Mol ATP/Mol Glutamin nur etwas weniger Energie als Glukose. Zur Berechnung des Wärmebeitrags aerober Prozesse ist es deshalb - zumindest bei Überwiegend anaeroben Bedingungen - unerheblich, welches Substrat tatsächlich oxidiert wird.

Um den Sauerstoffmangel zu kompensieren, steigern Fibroblasten unter anaeroben Bedingungen ihre Gärung. Zellen in senkrecht kultivierten Plastikgefäßen haben eine ca. 4,5fach höhere Laktatbildung als Kulturen in waagrecht rotierenden Plastikgefäßen. Folienkulturen in der Kammer haben sogar eine 6,6mal höhere anaerobe Glykolyse.

Durch die gesteigerte Gärung wird innerhalb von 24 Stunden fast die gesamte im Medium enthaltene Glukose verbraucht. Der

Glukosespiegel sinkt kurz vor dem Mediumwechsel auf 10 % der Ausgangskonzentration.

Bei Folienkulturen ist das Verhältnis von Zellzahl zu Kulturvolumen günstiger, so daß hier eine bessere Versorgung der Zellen möglich ist. Entsprechend ist deshalb auch die Laktatproduktion pro Fibroblast gesteigert.

5.4. Energetische Bilanz direkter und indirekter Kalorimetrie an Fibroblasten

Aus den Verbrauchs- bzw. Produktionsraten der Stoffwechselintermediäre Sauerstoff, Glukose, Laktat und Kohlendioxid lassen sich Wärmeproduktionsraten errechnen, die mit den kalorimetrisch gewonnenen Daten verglichen werden können.

Zur Umrechnung der Sauerstoffverbrauchsrate wurden die erwähnten Sauerstoffkalorienäquivalente (Tab. 1) benutzt, wobei es in der Gesamtbilanz kaum einen Unterschied macht, ob die Oxidation von Glukose oder Glutamin zugrunde gelegt wird.

Mit der Enthalpieänderung von $\Delta H = 149 \text{ kJ/Mol}$ Glukose, die sich aus dem Glukoseabbau zu Laktat ergibt, läßt sich eine Wärmebildungsrate errechnen, die den Gärungsanteil der Energieabgabe repräsentiert.

Die errechnete Wärmeabgabe aerober Kulturen und von Folienkulturen liegt recht nahe an der gemessenen Wärmeproduktion der Folienkulturen. Unabhängig von der Verfügbarkeit von Sauerstoff scheinen Fibroblasten deshalb im Betriebsstoffwechsel eine Leistung von ungefähr 50 pW/Zelle zu besitzen (Tab. 14).

Einen konstanten Energiebedarf von Chemostatkulturen unter verschiedenen Stoffwechselbedingungen haben auch Sinclair

Tab. 14: Ergebnisse direkter und indirekter Kalorimetrie an Fibroblasten verschiedener Kulturbedingungen

	Folie		Plastikgefäße		
	Original		verkürzt	Röhrchen	
	anaerob	anaerob	anaerob	aerob	
Sauerstoffverbrauchsrate	0,4 [■]	0,18	0,19	2,1	$\frac{f1}{s \cdot Zelle}$
Wärmeabgabe bei Veratmung von					
Glukose	8,4 [•]	3,8	4,0	44,5	pW/Zelle
Glutamin	7,6	3,5	3,7	40,5	pW/Zelle
Laktatbildung	503	332	356	76	$\frac{aMol}{s \cdot Zelle}$
Wärmeabgabe durch Gärung	37,5	24,7	26,5	5,7	pW/Zelle
insgesamt errechnete Wärmeabgabe	45,9 [★]	28,5 [★]	30,5 [★]	50,2 [★]	pW/Zelle
gemessene Wärmeabgabe	45,1 [●]	28,2 [●]	30,2 [●]	46,2 [●]	pW/Zelle
gemessene Wärmeabgabe	51 $\pm$ 5	/	34 $\pm$ 9	/	pW/Zelle
[★] für Glukoseoxidation, [●] für Glutaminoxidation, [■] geschätzt					

(1980) und Ehrlich et al. (1978) vermutet. Bei optimaler Kultur scheint darum eine Wärmeabgabe von 50 pW/Zelle für Fibroblasten charakteristisch zu sein. Dabei ist es unbedeutend, ob die Kulturen Überwiegend gären oder atmen. Sogar die Wärmeabgabe proliferierender Zellen ist mit 66 pW/Zelle nur wenig größer, so daß auch das Umschalten von Erhaltung auf Zellmultiplikation oder umgekehrt nur mit geringen Änderungen des Energietransfers verbunden zu sein scheint.

Die normale Leistung ruhender Zellen wird geringer, wenn die Konzentration des Energiesubstrats eine kritische Grenze erreicht.

Wegen der hohen Glykolyserate setzen anaerobe Kulturen in Plastikgefäßen die gesamte Glukose innerhalb von 26 Stunden zu Laktat um. Zellen einer Folienkultur steht fast 50 % mehr Medium zur Verfügung. Günstigere Ver- und Entsorgungsbedingungen bei Folienkulturen sind deshalb für die um ca. ein Drittel höhere Wärmeabgabe dieser Kulturen verantwortlich.

Durch die größere Austauschfläche zwischen Gasphase und KM wird auch die Sauerstoffdiffusion ins Medium erleichtert. Für Folienkulturen im Kalorimeter wurde darum eine Sauerstoffverbrauchsrate von $0,4 \text{ fl/s} \cdot \text{Zelle}$ geschätzt.

Der Gärungsanteil Überwiegend anaerob kultivierter Fibroblasten beträgt 80 - 85 %. Da Folienkulturen auch bei einer Stickstoffatmosphäre ca. 50 pW/Zelle freisetzen, müssen Fibroblasten zumindest kurzfristig in der Lage sein, auch ihren gesamten Energiebedarf durch anaerobe Glykolyse zu sichern.

Unter aeroben Bedingungen vermögen Fibroblasten andererseits einen großen Teil ihres Energiebedarfs durch Atmung zu decken, so daß der Gärungsanteil 24 - 32 % in Warburggefäßen und 13 - 21 % in Plastikgefäßen beträgt.

Die kalorimetrisch bestimmten Wärmeproduktionsraten stimmen gut mit den errechneten Werten überein. In beiden Fällen liegt der errechnete Wert nur ca. 10 % unter dem gemessenen (Tab. 14).

Sofern bei gleichen Kulturbedingungen gearbeitet wird, kann also eine befriedigende Übereinstimmung zwischen direkten und indirekten kalorimetrischen Ergebnissen festgestellt werden.

5.5. Anthralin-Einfluß auf konfluente Fibroblastenkulturen

5.5.1. Wirkungsspektrum

Anthralin wirkt auf verschiedenen Niveaus. Es wurde die Beeinflussung des Sauerstoffverbrauchs, der Kohlendioxidbildung,

der Wärmeabgabe, der Laktatbildung und der Lebensfähigkeit der Zellen verfolgt.

Die Kohlendioxidproduktion, die bei Vertebraten ebenfalls ein Maß für die Atmung ist, wird in gleichen Umfang gehemmt wie der Sauerstoffverbrauch. Dieser ist gegenüber Anthralin wesentlich empfindlicher als die Wärmeproduktion, deren Hemmung der Anthralinwirkung auf die Laktatbildung entspricht. Die Zahl der Überlebenden Zellen geht erst dann merklich zurück, wenn die Wärmeproduktion bereits auf 50 % und die Atmung auf 25 % reduziert sind (Abb. 45).

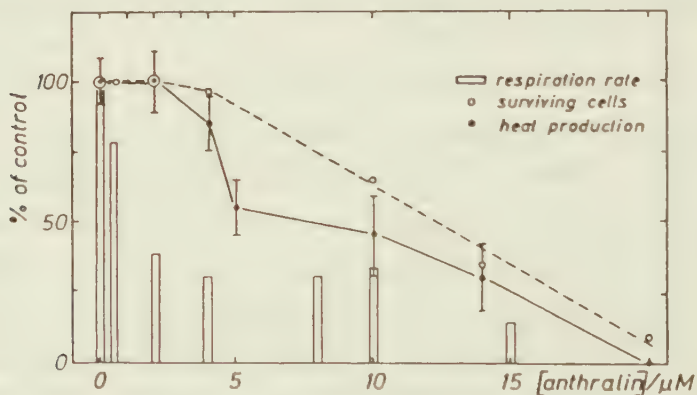


Abb. 45: Hemmung der Atmungsaktivität, der Wärmeproduktion und der Überlebensfähigkeit bei Fibroblasten nach Anthralinapplikation

Nacheinander werden also zuerst die Atmung ($K_{0,5} = 1 \mu\text{M}$), die Wärmeentwicklung ($K_{0,5} = 7 \mu\text{M}$) und dann die Laktatbildung ($K_{0,5} = 8 \mu\text{M}$) gehemmt und zuletzt wird das Absterben der Fibroblasten beobachtet ($K_{0,5} = 12,5 \mu\text{M}$).

Ähnliche Unterschiede ergeben sich auch, wenn man die Zeiten vergleicht, nach denen die Effekte erstmals auftreten.

Während der Sauerstoffverbrauch bereits nach wenigen Sekunden beeinflußt ist, kann die Abtötung von Zellen erst nach mehreren Stunden festgestellt werden. Aus technischen Gründen wird auch eine Änderung der Wärmeproduktion und der Laktatbildung erst nach 30 - 60 Minuten erfaßt. Die Wirkung selbst kann aber schon früher eintreten.

In der Literatur liegen nur wenige Daten über den Anthralineinfluß auf den Stoffwechsel menschlicher Zellkulturen vor. Eigene frühere Untersuchungen haben bereits eine Hemmung der Atmung ergeben (Pätel et al., 1981). Raab (1969) konnte eine Inhibition des Sauerstoffverbrauchs an menschlichen Hautstücken nach Anthralineinwirkung nachweisen.

Von mehreren Forschergruppen wurde die Hemmung des Thymidineinbaus in DNA an wachsenden Kulturen verfolgt. Diese Inhibition ist umso stärker, je schneller die Zellen wachsen (Klem, 1978). Nach Clark & Hanawalt (1981) erfolgt eine Hemmung der DNA-Replikation um 50 % durch $1,1 \mu\text{M}$ Anthralin. Nach Jacques & Reichert (1981) reichen hierfür bereits $0,3 \mu\text{M}$ Anthralin, wobei der Effekt aber erst nach mehreren Stunden auftritt. Eine komplette Hemmung der Zellmultiplikation erfolgt bei Fibroblasten des Menschen mit $10 \mu\text{M}$ (Dykes et al., 1981).

Diese Untersuchungen an proliferierenden Kulturen sind nicht ohne weiteres mit den eigenen Ergebnissen vergleichbar, da ruhende Zellen in der Regel gegenüber Pharmaka weniger empfindlich sind (Klem, 1978).

In Abb. 46 werden der relative Einfluß von Anthralin auf die Wärmeproduktion und den Sauerstoffverbrauch in Abhängigkeit von der Überlebensrate dargestellt. Zum besseren Vergleich wurde der Sauerstoffverbrauch in Leistungseinheiten umge-

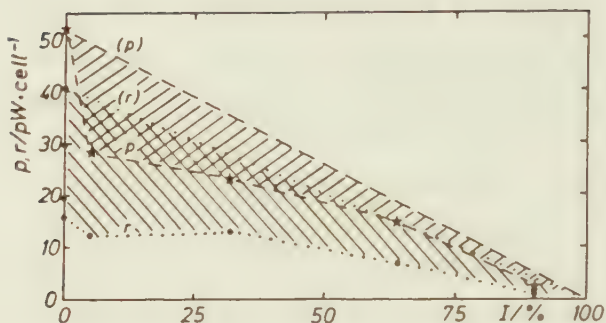


Abb. 46: Abhängigkeit der Wärmeentwicklung p und der Atmung r vom Grad der Zellinaktivierung I nach Anthralinbehandlung, Einzelheiten s. Text

rechnet.

Die mit (p) und (r) bezeichneten Geraden werden erwartet, wenn die Hemmung der Wärmeproduktion bzw. der Atmung in gleichem Maße erfolgen wie die Abtötung der Zellen. p und r stellen die tatsächlich gefundenen Zusammenhänge zwischen Zellinaktivierung und Wärmeproduktion bzw. Zellatmung für bestimmte Anthralinkonzentrationen dar.

Die schraffierten Flächen veranschaulichen, in welchem Umfang die Wärmeproduktion und die Atmung stärker inhibiert werden als der Lebensfähigkeit der Zellen entspricht. Für die Darstellung der Atmunschwächung und des Inaktivierungsgrads wurden Werte der manometrischen Messungen unter Luftatmosphäre verwendet. Eine noch stärkere Reduzierung der Atmung im Verhältnis zur Zellinaktivierung würde sich ergeben, wenn manometrische Werte unter Sauerstoffbedingungen oder polarographische Daten Verwendung fänden.

In weiten Bereichen der Anthralinwirkung besteht ein fast linearer Zusammenhang zwischen der Zellinaktivierung einer-

seits und der Hemmung der Wärmeabgabe sowie der Atmung andererseits, so daß weitere Reduzierungen der Stoffwechselleistungen nicht die spezifischen Raten betreffen, sondern auf Zelltötung oder Zellverlust zurückgeführt werden müssen.

Dies wird noch deutlicher, wenn man nicht die gesamte Kultur betrachtet, sondern den reduzierten Stoffwechsel auf die überlebenden Zellen bezieht (Abb. 47). Danach ist die Wärmeproduktionsrate im Konzentrationsbereich von $5\ \mu\text{M}$ bis $16\ \mu\text{M}$ und die Sauerstoffverbrauchsrate im Bereich von $2\ \mu\text{M}$ bis $16\ \mu\text{M}$ nahezu unverändert.

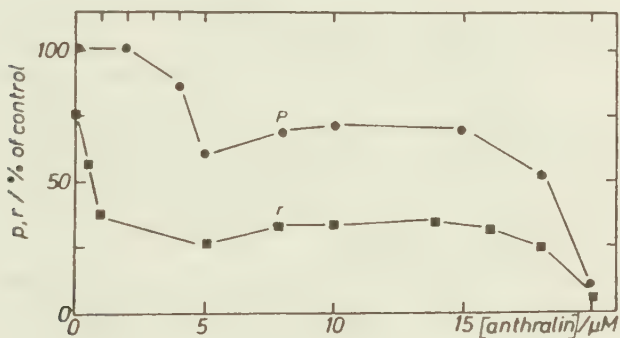


Abb. 47: Abhängigkeit der spezifischen Raten der Wärmeproduktion p und der Respiration r von der Anthralinkonzentration des Mediums

Aus der gemessenen Wärmeentwicklung einer Kultur läßt sich unter Berücksichtigung des kleinen Atmungsanteils die Abhängigkeit der Fermentation von der Anthralinkonzentration abschätzen (Abb. 48). Die Kurven der Wärmeproduktion und der Fermentation unterscheiden sich nur für kleine Anthralinkonzentrationen.

Wenn die Laktatproduktion unter anaeroben Bedingungen in

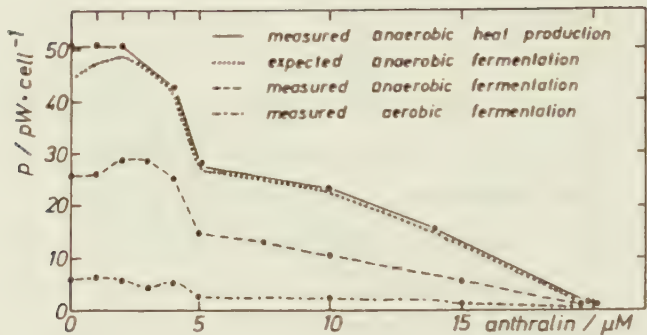


Abb. 48: Abhängigkeit der Wärmeproduktion und der Fermentation von der Anthralinkonzentration des Mediums

Leistungseinheiten umgerechnet wird, ermöglicht sie einen direkten Vergleich mit der erwarteten anaeroben Fermentation. Beide Kurven unterscheiden sich zwar quantitativ aber nicht qualitativ. Im wesentlichen reflektiert die Wärmeproduktionskurve den Anthralineinfluß auf die Laktatbildung Überwiegend gärender Zellen.

Für die quantitativen Unterschiede zwischen der erwarteten Gärungskurve und der Laktatbildungskurve sind wahrscheinlich die schon unter 5.4. diskutierten schlechteren Kulturbedingungen für Kulturen in Plastikgefäßen gegenüber Folienkulturen ausschlaggebend.

Zusammenfassend muß festgestellt werden, daß die anaerobe Wärmeentwicklung und die anaerobe Fermentation die gleiche Abhängigkeit von der Anthralinkonzentration zeigen (Abb. 48). Beide Kurven sind Ausdruck derselben Anthralinwirkung auf die Kultur.

Wenn die Hemmung der Wärmeabgabe durch Anthralin bei atmen den Zellen ähnlich verläuft wie dies bei gärenden Zellen

der Fall ist, dann müßten Fibroblasten ihre anaerobe Glykolyse erheblich steigern können, um die größere Atmungshemmung auszugleichen. Die Anthralinbehandlung müßte zu einer fast dreimal höheren Laktatbildung führen.

Entsprechende Messungen haben aber gezeigt, daß die Laktatbildung sich nur unwesentlich ändert (Abb. 48). Offensichtlich verlieren atmende Fibroblasten nach einer Anthralinbehandlung die Fähigkeit, durch eine gesteigerte Gärungsaktivität ihre Atmungsaktivität zu kompensieren. Der Verlust dieses Regelmechanismus bewirkt, daß die Wärmeproduktion atmender Zellen stärker gehemmt wird als gärender Zellen.

Es konnten Anthralinwirkungen auf drei Ebenen der Zelle beobachtet werden.

Kleine Anthralinkonzentrationen ($0,3-2 \mu\text{M}$) beeinflussen wahrscheinlich über eine Schädigung der Mitochondrien die Atmungstätigkeit der Fibroblasten. Etwas höhere Konzentrationen ($> 2 \mu\text{M}$) hemmen die Laktatproduktion und führen deshalb bei überwiegend gärenden Zellen zur Reduzierung der Wärmeabgabe. Noch höhere Anthralinkonzentrationen ($> 5 \mu\text{M}$) führen zum Absterben der Zellen.

Wenn mehrere Zellfunktionen bei unterschiedlichen Konzentrationen des Pharmakons und zu verschiedenen Zeitpunkten ausfallen, zeugt dies für eine multiple Wirkung des Pharmakons.

Die höhere Empfindlichkeit atmender Zellen kann auf einer Schädigung der Mitochondrienfunktion beruhen. Diesen Verdacht hat auch Zetterberg (1977, 1981) geäußert, der eine spezifische Bindung von Anthralin an die mitochondriale DNA von Hefen zeigen konnte und eine ähnliche Bindung auch für Zellen

des Menschen postuliert.

Die spezifische Bindung von Anthralin an die DNA der Mitochondrien löst eine Atmungshemmung aus, während weniger spezifische Bindungen an chromosomaler DNA cytotoxische Effekte erklären können. Ebenso kann aber auch der Block gewisser Enzymsysteme toxisch wirken.

5.5.2. Einfluß des Sauerstoffs

Bei polarographischen Messungen wird nach der Anthralinzugabe ein mit der Versuchszeit kontinuierlicher Abfall des Sauerstoffverbrauchs beobachtet. Wenn die applizierte Dosis größer als $1 \mu\text{M}$ Anthralin ist, geht die Rate innerhalb der Versuchszeit auf Null zurück.

Bei manometrischen Messungen tritt bei einer Luftatmosphäre ein Kurvenverhalten auf, wie es auch von kalorimetrischen Messungen her bekannt ist: auch hohe Anthralinkonzentrationen führen zu einer über viele Stunden konstanten Verbrauchsrate. Das unterschiedliche Verhalten der Kurven ist im Meßverfahren begründet, da polarographische Messungen bei höheren Sauerstoffkonzentrationen stattfinden als manometrische Untersuchungen.

In Warburggefäßen kann die Sauerstoffdiffusion erleichtert werden, in dem der Gasraum des Gefäßes mit Sauerstoff gefüllt wird. Entsprechende Versuche zeigen, daß es tatsächlich zu einer verstärkten Atmungsinaktivierung der Zellen kommt. In Abb. 49 ist die verbleibende Respirationsrate der drei Versuchsbedingungen über der Anthralinkonzentration aufgetragen. Dadurch wird der kooperative Hemmeffekt des Sauerstoffs besonders deutlich.

Fibroblasten sind also gegenüber Anthralin umso empfind-

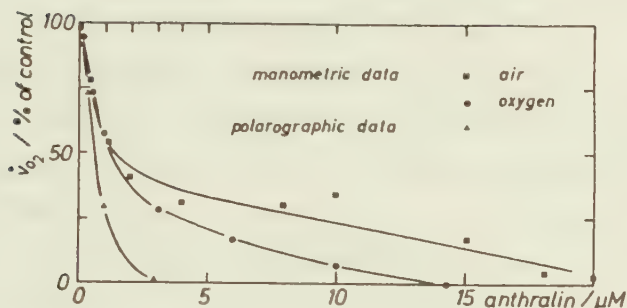


Abb. 49: Abhängigkeit der Atmungshemmung unter verschiedenen Kulturbedingungen von der Anthralinkonzentration, manometrische Werte 6 Stunden und polarographische Werte 3 Stunden nach der Zugabe des Pharmakons festgestellt

licher, je mehr Atmungsprozesse zum Energieumsatz beitragen. Mit der Komplexität eines Systems wächst auch seine Anfälligkeit gegenüber einem Pharmakon. Über das glykolytische Enzymmuster hinaus benötigen atmende Zellen nämlich funktionsfähige Mitochondrien, in denen Krebszyklus und Elektronenübertragungsmechanismen ablaufen. Wenn Anthralin die Mitochondrienfunktion beeinträchtigt, wirkt sich dies auf die Wärmeproduktion atmender Zellen aber nicht auf die Wärmeproduktion gärender Zellen aus.

Die im Anschluß an die kalorimetrischen und manometrischen Versuche ermittelte Lebensfähigkeit der Fibroblasten zeigt, daß der cytotoxische Anthralineffekt 15 Stunden nach der Applikation des Pharmakons unabhängig von den Sauerstoffbedingungen der Kultur ist. Die Überlebensfähigkeit gärender und atmender Zellen wird gleich stark beeinflusst (Abb. 21).

5.5.3. Anthralinstabilität und -aufnahme, Irreversibilität der Effekte und Anthralinresistenz

Alle anthralinhaltigen Medien wurden - bis auf wenige Versuche zur Alterung des Pharmakons - unmittelbar nach ihrer Herstellung benutzt, so daß zwischen Fertigstellung und Anwendung nie mehr als ein bis zwei Minuten verstrichen sind.

In chromatographischen Untersuchungen kann zwei Minuten nach der Überführung von Anthralin in KM bei pH 7,2 noch fast die gesamte eingewogene Menge nachgewiesen werden. Oxidations- und Dekompositionsprodukte treten erst dann in meßbaren Konzentrationen auf, wenn die Wirkung auf zellulärem Niveau eingetreten ist.

Sowohl kalorimetrische als auch manometrische Versuche zeigen nämlich, daß Anthralin bereits innerhalb von zwei Minuten eine für die Konzentration maximale Schädigung der Zellen auslöst. Ein anschließender Austausch des anthralinhaltigen Mediums mit anthralinfreiem Medium hat keinen geringeren Effekt als die permanente Kultur in anthralinhaltigem Medium zur Folge. Auch nach mehrfachem Waschen tritt keine Verminderung der Hemmwirkung ein.

Im gleichen Sinn müssen auch polarographische Versuche interpretiert werden, bei denen die Zellen ca. 20 Minuten mit Anthralin behandelt wurden und bei späteren Messungen anthralinfreies Medium erhielten (Abb. 16). Trotzdem ist der Effekt bei jeder folgenden Messung verstärkt.

Wenn Anthralin schneller aufgenommen wird, als es in zellfreiem Medium zerfällt, ist die Stabilitätsfrage nur von sekundärer Bedeutung. Für die Instabilität scheint auch der Serumgehalt von entscheidender Wichtigkeit zu sein, da bei

157

Untersuchungen von Jacques (persönliche Mitteilung) Anthralin in serumfreiem KM wesentlich stabiler ist.

Auch das Lösungsmittel für Anthralin scheint selbst keinen Einfluß auszuüben, da entsprechende Untersuchungen mit Aceton oder Ethanol als Lösungsmittel die gleiche Wirkung zeigten (Pätel et al., 1982).

Wenn in zellfreiem KM nach zwei Minuten noch 94 % der ursprünglichen Anthralinmenge nachgewiesen werden können, bedeutet dies nicht, daß auch im Medium einer Zellkultur nach zwei Minuten noch Anthralin in seiner aktiven Form vorliegen muß.

Dagegen sprechen u.a. Versuche, bei denen zwei Kulturen hintereinander mit demselben Medium beimpft wurden (Abb. 17). Der Sauerstoffverbrauch der zweiten Population wird durch ein ursprünglich anthralinhaltiges Medium ($1 \mu\text{M}$) nicht mehr gehemmt. Alles Anthralin wird in zwei Minuten gebunden oder inaktiviert. Zwei Minuten altes anthralinhaltiges Medium ohne vorherigen Zellkontakt hat dagegen noch eine erhebliche Wirkung auf den Sauerstoffverbrauch, da das Anthralin noch weitgehend aktiv ist.

Wenn ein Pharmakon die Stoffwechselaktivität hemmt, sind zwei Situationen vorstellbar:

1. alle Zellen der Kultur sind gleich empfindlich und werden in gleichem Ausmaß gehemmt oder
2. es liegt eine Fraktion resistenter Zellen vor, die weniger sensibel ist und weniger stark betroffen wird.

Sollte ein Teil der Zellkultur resistent sein, dürfte die Fraktion unempfindlicher Zellen nicht kleiner werden, wenn sich die Anthralinkonzentration beim Mediumwechsel nicht erhöht. Mehrere Applikationen mit gleicher Anthralindosis verstärken aber die Hemmwirkung (Abb. 12), so daß daraus gefolgert

wird, daß alle Fibroblasten - mit kleinen individuellen Abweichungen - in gleichem Maß betroffen sind.

5.6. Anthralin-Einfluß auf Hefekulturen

5.6.1. Einfluß auf proliferierende Kulturen

Flow-kalorimetrisch konnte nicht das gesamte Wachstumsverhalten erfaßt werden. Deshalb sind auch keine Aussagen bezüglich der Gesamtenergieabgabe der Kultur möglich.

Unbeeinflusste Kulturen erreichen unter den aeroben Bedingungen im Flow-Kalorimeter einen zwei- bis viermal höheren Zellendtitel als im Batch-Kalorimeter. Auch die maximale Leistung beträgt mit $P_{\max} = 1,2 \text{ W/l}$ das dreifache einer Batch-Kultur. Aerobe Verhältnisse können von Hefen also wesentlich besser genutzt werden.

Anthralin hemmt das Wachstum von Hefen. Es bewirkt eine Verschiebung der Kurvenmaxima und führt zu über viele Stunden dauernden Lag-Phasen. Nur ein Bruchteil überlebender Zellen bewirkt das Hochwachsen der Kultur. Auch die Anthralinapplikation in der exponentiellen Wachstumsphase (Abb. 24) hat eine Verzögerung zur Folge. Die Hemmung ist aber weniger ausgeprägt als die gleich hohe Anthralingabe zu Versuchsbeginn.

Bei Untersuchungen im Batch-Kalorimeter kann der ganze Wachstumsverlauf verfolgt werden. Die Energieabgabe pro Liter Medium wird durch Anthralin weniger stark verändert, als die Energieabgabe pro Zellteilung (Tab. 7), d.h. es kann der gesamte Glukosevorrat genutzt werden, aber mit zunehmender Zellschädigung muß mehr Energie für Erhaltungs- und Reparaturprozesse als zur Zellteilung aufgewandt werden.

Gleiche Anthralinkonzentrationen üben auf Kulturen mit

zehnmal größerem Anfangstiter geringere Effekte aus, d.h. die Zellzahl zu Versuchsende liegt höher, der Prozentsatz toter Zellen ist kleiner und vor allem die Energieabgabe pro Zellteilung ist geringer. Auch die Verschiebung der Kurvenmaxima ist ein Indiz für die Abhängigkeit der Anthralinwirkung vom Verhältnis der Moleküle pro Zelle (Abb. 50).

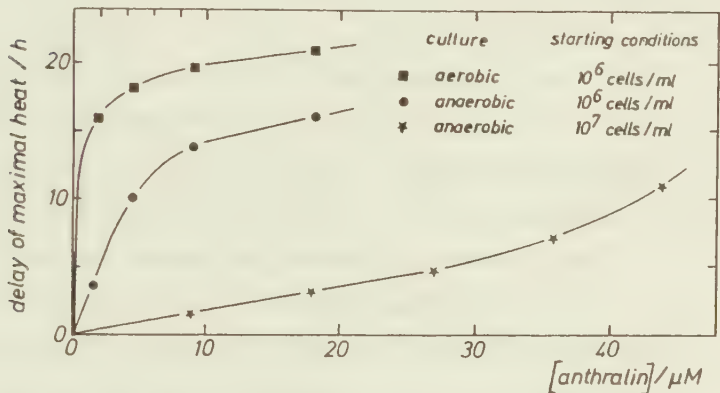


Abb. 50: Zeitliche Verschiebung der Kurvenmaxima bei verschiedenen Kulturbedingungen in Abhängigkeit von der Anthralinkonzentration

Thermogramme unbehandelter Kulturen zeigen sechs bis acht Stunden nach Versuchsbeginn ein Maximum. Mit Anthralinbehandlung tritt dieses Maximum um so später auf, je empfindlicher die Kulturen sind (Abb. 50). Batch-Kulturen werden weniger stark in ihrer Wärmeabgabe gehemmt als gut belüftete Kulturen flowkalorimetrischer Untersuchungen.

5.6.2. Einfluß auf ruhende Kulturen

Bei Hefen kann durch die Wahl der geeigneten Glukosekonzentration bereits festgelegt werden, ob die Zellen überwiegend gären oder atmen.

Hefen in 5 mM-GPP besitzen nach manometrischen Messungen eine um 25 % höhere und nach polarographischen Messungen sogar eine um 34 % höhere Sauerstoffverbrauchsrate als Hefen in 100 mM-GPP. Die reduzierte Glukoseoxidation können Hefen in 100 mM-GPP durch eine Erhöhung der Glykolyserate um das siebenfache wieder ausgleichen, so daß unabhängig von der Glukosekonzentration ca. 27 pW/Zelle während des Betriebsstoffwechsels freigesetzt werden.

Wenn Anthralin auf Atmung und Gärung der Hefen ähnlich unterschiedlich wirkt wie bei Fibroblasten, dann sollten die Thermogramme betriebsstoffwechselnder Hefen von der Glukosekonzentration abhängen. Tatsächlich sind Hefen, die Glukose vor allem veratmen, Anthralin gegenüber sensibler (Abb. 26 und Abb. 27). Da die Atmung selbst unter den beiden Kulturbedingungen nicht andersartig beeinflusst wird (Abb. 36), müssen die Unterschiede in der Gärungsaktivität der Hefen begründet sein.

In dem Maß, wie Atmungsprozesse zur Sicherstellung des Energiebedarfs ausfallen, schalten Hefen verstärkt auf fermentative Aktivitäten um (Abb. 39). Dies gilt für Hefen in 100 mM-GPP und in 5 mM-GPP. In Anwesenheit von $9 \mu\text{M}$ Anthralin ist die Gärungsrate gegenüber einer anthralinfreien Kultur ca. 2,8fach erhöht.

Trotz gesteigerter Fermentation kann die reduzierte Atmung aber nie vollständig kompensiert werden, so daß die insgesamt freigesetzte Energie über den gesamten untersuchten Konzentrationsbereich des Pharmakons vermindert ist.

Insbesondere bei niedriger Glukosekonzentration führt der hohe fermentative Glukoseabbau bald zur Glukoseerschöpfung, so daß die Wärmeproduktion hier nach ungefähr fünf Stunden steil

abfällt. Der geringe Abfall der Wärmeentwicklung in 100 mM-GPP beruht auf einer langsamen Inaktivierung der Zellen.

Unterschiede in den Thermogrammen ergeben sich bei verschiedenen Glukosekonzentrationen also nicht aus einer andersartigen Sensibilität der Kulturen, sondern aus dem unzureichenden Glukoseangebot in 5 mM-GPP. Dies wird besonders deutlich, wenn man die Anthralinwirkung in Versuchen vergleicht, bei denen die Zugabe fünf Stunden nach Beginn des Versuchs erfolgte.

In 100 mM-GPP erreicht die Hemmung das gleiche Niveau wie in Versuchen, bei denen die Applikation zu Versuchsbeginn stattfand. Kulturen in 5 mM-GPP zeigen dagegen mehrere Stunden lang eine noch höhere Wärmeabgabe, bevor es zeitverschoben zum charakteristischen Abfall der Wärmeabgabe kommt.

Wenn man zu einer anthralinbehandelten Kultur fünf Stunden nach Versuchstart in 5 mM-GPP Glukose gibt, erhöht sich die Energieabgabe leicht (Pätel, unveröffentlichte Ergebnisse).

Durch Auftragung der Wärmeproduktionsrate gegenüber der Sauerstoffverbrauchsrate wird die unterschiedliche Anthralinwirkung auf Atmung und Gärung besonders deutlich (Abb. 51). Für beide Kulturbedingungen existieren zwei Sauerstoffkalorienäquivalente. Im Konzentrationsbereich unter $5 \mu\text{M}$ Anthralin entspricht der oxykalorische Koeffizient ungefähr dem theoretisch zu erwartenden Wert von 21 kJ/l O_2 , d.h. der verringerte Sauerstoffverbrauch schlägt sich in einer entsprechend erniedrigten Wärmeproduktion nieder.

Ungefähr bis zu einer Konzentration von $5 \mu\text{M}$ tolerieren die Zellen eine Verminderung ihrer Leistung durch die Inhibition der Atmung. Bei höheren Anthralinkonzentrationen wird wesentlich mehr Wärme erzeugt, als dem Sauerstoffverbrauch

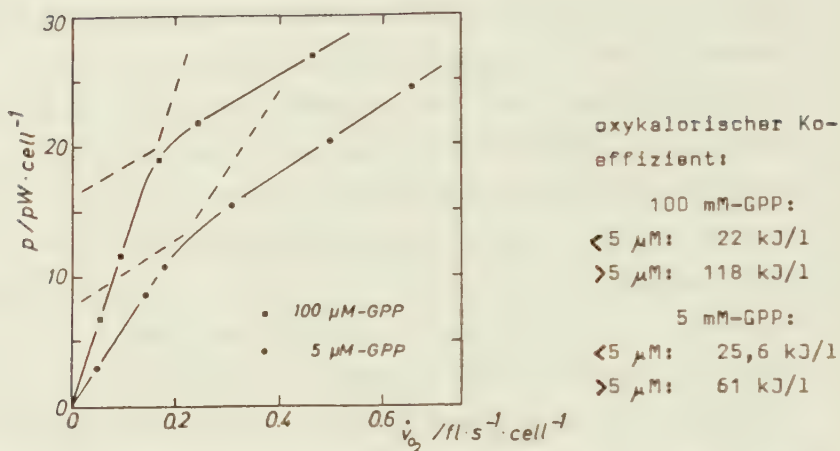


Abb. 51: Zusammenhang zwischen der Wärmeproduktionsrate p und der Sauerstoffverbrauchsrate $\dot{v}_{O_2}$ für verschiedene Anthralinkonzentrationen

entspricht. Zur Aufrechterhaltung der Lebensfunktionen wird also die Fermentation gesteigert. Aufgrund der Glukoseerschöpfung beträgt das Sauerstoffkalorienäquivalent für Kulturen in 5 mM-GPP sechs Stunden nach Versuchsbeginn nur noch 50 % des Werts für Kulturen in 100 mM-GPP.

Der Anthralineinfluß auf die aerobe Wärmeproduktion und die Überlebensrate ist um so größer, je wichtiger Atmungsprozesse für die Kultur sind. Hefen, bei denen Glukoseoxidation vorherrscht, überleben die Anthralinbehandlung seltener als Hefen mit Glukosevergärung. Noch resistenter sind Zellen, die wegen mangelnden Substratangebots lediglich endogenen Stoffwechsel betreiben.

Je komplexer der Stoffwechsel ist, desto empfindlicher wird er geschädigt. So fällt die Schädigung der Aufnahme- und Transportsysteme nur bei Zellen mit exogenem, nicht aber mit endogenem Betriebsstoffwechsel ins Gewicht. Ähnlich sensibler sind

Hefen, die kompliziert gebaute Mitochondrien benötigen.

5.6.3. Anthralinaufnahme, Einfluß des Zelltiters und des Alters der Anthralinlösung

Daß wachsende Kulturen mit höherem Anfangstiter gegenüber Anthralin weniger empfindlich sind als Kulturen, die mit 10^6 Zellen/ml gestartet wurden, ist bereits erwähnt worden. Ähnliche Beobachtungen wurden auch an Hefen der stationären Phase gemacht, wo die Anthralinwirkung mit zunehmender Zellzahl geringer wird (Abb. 38). Es reicht also nicht nur eine bestimmte molare Konzentration, sondern es muß auch eine gewisse Zellzahl pro Molekül vorliegen, um reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten.

Die Wirkungen zweier gleich kleiner Anthralindosen addieren sich zu einem Gesamteffekt, der auch von einer einmal applizierten doppelt so hohen Anthralingabe ausgelöst wird (Abb. 30).

In einigen Versuchen wurde ein Medium mit $18 \mu\text{M}$ Anthralin bis zu 60 Minuten bei Dunkelheit und Raumtemperatur gerührt, bevor die Beimpfung mit Hefen erfolgte. Trotzdem konnte immer die gleiche Hemmung der Wärmeproduktion bzw. der Atmung gemessen werden (Abb. 31). Dies widerspricht chromatographischen Untersuchungen, nach denen die Anthralinkonzentration innerhalb einer halben Stunde auf 75 % und innerhalb einer Stunde auf 60 % ihrer ursprünglich nachweisbaren Menge zurückgeht (s. Anhang, Teil I, Abb. 51).

Anthralin wird von Hefen ähnlich schnell aufgenommen wie von Fibroblasten. Applikationen, die länger als eine Minute dauern, bewirken bereits maximale Schädigung. Eine maximale Schädigung nach zwei bis fünfminütiger Anthralinbehandlung hat auch Zetterberg (1977) an wachsenden Hefen gefunden.

Eine zweite Hefepopulation wird in ihrer Wärmeproduktion nicht mehr gehemmt, wenn das Medium mit der ersten Kultur länger als 40 Sekunden in Kontakt war. Offensichtlich reicht diese kurze Zeit, um alles Anthralin zu binden oder zu inaktivieren. Ein längeres Verweilen der Zellen im Medium führt deshalb zu keiner weiteren Inaktivierung.

5.7. Vergleich der Anthralin-Wirkung auf den Stoffwechsel von Fibroblasten und von Hefen

Die Wärmeproduktion unbehandelter Hefekulturen ist ca. halb so groß wie die menschlicher Fibroblasten. Dabei spielen die Sauerstoffbedingungen eine untergeordnete Rolle, da sowohl Hefen als auch Fibroblasten sich ändernden Bedingungen anpassen. Der Sauerstoffverbrauch eines Fibroblasten ist unter aeroben Bedingungen ca. dreimal größer als der einer Hefezelle.

Während bei Hefen keine methodischen Unterschiede zwischen polarographischen und manometrischen Messungen gefunden werden, müssen entsprechende Differenzen bei Fibroblasten im Zusammenhang mit der unterschiedlichen Sauerstoffversorgung der Kulturen gesehen werden.

Durch Anthralin werden die Wärmeproduktion und der Sauerstoffverbrauch gehemmt. Hohe Konzentrationen führen auch zum Zelltod. Hefen sind auf allen Ebenen resistenter als Fibroblasten. Anthralin zeigt das gleiche Wirkungsspektrum. Die Sensibilität der Zellen weist folgende Reihenfolge auf:

Organismus	Medium	Atmung > Wärmeabgabe > Überleben		
Fibroblasten	KM	$K_{0,5} = 1 \mu M$	$K_{0,5} = 7 \mu M$	$K_{0,5} = 12,5 \mu M$
Hefen	100 mM-GPP	$5 \mu M$	$13,5 \mu M$	$41 \mu M$
Hefen	5 mM-GPP	$5 \mu M$	$7,5 \mu M$	$45 \mu M$

Der verhältnismäßig niedrige Wert für die halbmaximale Hemmung der Wärmeproduktion bei Hefen in 5 mM-GPP ergibt sich aus dem Glukosemangel, der bereits sechs Stunden nach Versuchsbeginn entscheidend wird. Die $K_{0,5}$ -Werte der Atmung beziehen sich auf Messungen in Warburggefäßen bei Luftatmosphäre. Lediglich der $K_{0,5}$ -Wert zur Überlebensrate der Fibroblasten wurde nicht sechs Stunden nach der Anthralinapplikation, sondern erst zu Versuchsende (nach ca. 24 Stunden) gemessen. Um schon sechs Stunden nach der Zugabe des Pharmakons eine Abtötung auf 50 % zu erhalten, muß deshalb sicherlich eine wesentlich höhere Konzentration benutzt werden.

Kleine Anthralingaben führen bei Hefen zu einer kurzfristigen Stimulation der Atmungstätigkeit (Abb. 34 und Abb. 35), die bei Fibroblasten nicht beobachtet wird. Bei Hefen wird der Sauerstoffverbrauch auch unabhängig von der Atmungstätigkeit der Zellen gehemmt (Abb. 36). Bei Fibroblasten hingegen wird die Atmung um so stärker inhibiert, je mehr die Zellen atmen (Abb. 49).

Hefen aerober Kulturen, deren Atmung durch Anthralin gehemmt wird, können durch eine Steigerung der Gärungsrate die Energieversorgung teilweise sichern. Diese Regulationsfähigkeit verlieren Fibroblasten aerober Kulturen nach Anthralinbehandlung.

Die Laktatproduktion der Fibroblasten zeigt im Konzentrationsbereich, der die Atmung bereits stark inhibiert, nur minimale Änderungen. Höhere Anthralinkonzentrationen hemmen schließlich auch die Gärung (Abb. 48).

Hefen mit Glukosevergärung überleben die Anthralinbehandlung eher als Hefen, die Glukose veratmen. Dies trifft nicht

für Fibroblasten zu. Die Inaktivierungskurven sind identisch.

Trotz einiger Untersuchungen zur Inhibition des Thymidin-Einbaus in die DNA an Kulturen menschlicher Zellen (Klem, 1978, Dykes et al., 1981, Jacques & Reichert, 1981, Clark & Hanawalt, 1981) und einiger Studien zur Bindung von Anthralin an die DNA (Swanbeck & Thyraesson, 1965, Swanbeck & Zetterberg, 1971) herrschen über die molekularen Wirkungsmechanismen des Anthralins noch Unklarheiten. So gibt es zur Zeit keine zufriedenstellende Erklärung für die Hemmung des gesteigerten epidermalen Zellzyklus psoriatischer Haut durch Anthralin.

Im Vergleich mit Untersuchungen an Hefen sollte u.a. auch geklärt werden, ob gewisse Anthralinwirkungen genereller Natur sind, d.h. auch auf andere Eukaryoten übertragbar sind. Hefen bieten sich für derartige Untersuchungen an, da sie einfach zu kultivieren sind, ihr Energiestoffwechsel sehr gut bekannt ist und sie sowohl aerob als auch anaerob leben können.

Tatsächlich stellen Hefen aber nicht unbedingt ein Modell der Anthralinwirkung auf Fibroblasten dar. Trotz vieler Übereinstimmender Befunde können Ergebnisse von Hefen nicht in jedem Fall auf Fibroblasten übertragen werden. Genauso wenig sind umgekehrte Schlüsse zulässig. Allgemeiner Natur scheinen aber folgende Beobachtungen zu sein:

1. die schnelle Aufnahme und Inaktivierung des Anthralins,
2. die Irreversibilität der Effekte,
3. die Hemmung der Zellmultiplikation,
4. die Hemmung der Zellatmung,
5. die Hemmung der Fermentation,
6. die cytotoxische Wirkung und
7. die Sensibilitätsfolge: Atmung > Gärung > Überleben.

Andere Phänomene könnten singuläre Erscheinungen bei Hefen sein:

1. die Stimulation der Kohlendioxidbildung im Konzentrationsbereich 2 bis 18 μM Anthralin,
2. die Stimulation der Atmung im Konzentrationsbereich 0,5 bis 2 μM Anthralin und
3. die Abhängigkeit der Überlebensfähigkeit vom Sauerstoffgehalt des Mediums.

Oder sie betreffen nur Fibroblasten in Zellkultur: z.B. die Abhängigkeit der Atmungshemmung von der Atmungsaktivität der Zellen.

In dieser Arbeit geht es u.a. auch um die Frage, ob die Kalorimetrie als Methode überhaupt geeignet ist, eine Pharmawirkung auf den Energiestoffwechsel relevanter Zellen des Menschen zu demonstrieren. Entsprechende Untersuchungen an Mikroorganismen werden bereits routinemäßig durchgeführt (Reis, 1975, Semenitz, 1978, Semenitz & Tiefenbrunner, 1977, Schaarschmidt et al., 1979, Beezer & Choudhry, 1980).

Tatsächlich kann die Mikrok calorimetrie Einblicke in den Energiestoffwechsel von in vitro-Kulturen menschlicher Zellen geben und Zusammenhänge widerspiegeln, die ihre Erklärung in ergänzende manometrische, polarographische oder andere Untersuchungen finden.

5.8. Kalorimetrischer Screening-Test zur Wirkung von Pharmaka auf Zellkulturen des Menschen

Neben Anthralin wurde auch der Einfluß von Anthraquinon, dem Dimer, Acetylanthralin und Anthralinmaleat auf die Wärme-

abgabe dermalen Fibroblasten untersucht. Ziel dieser Versuche war es:

1. die Wirkung dieser Pharmaka mit der des Anthralins zu vergleichen, um auch Derivate zu erfassen, denen bei der Psoriasisstherapie eine Bedeutung zukommen könnte und
2. zu überprüfen, ob die Methode sich dazu eignet, unterschiedliche Einflüsse verschiedener Pharmaka auf den Energiestoffwechsel vertebraler Zellen aufzuzeigen.

Da diese Untersuchungen in den Kammern des Bioflux-Kalorimeters durchgeführt wurden, kann die Wärmeabgabe annähernd mit der Gärungsaktivität der Fibroblasten gleichgesetzt werden. Anthralin, Acetylanthralin und das Dimer inhibieren die Wärmeproduktion ungefähr in gleichem Maß, während Anthralinmaleat ein wesentlich potenterer Inhibitor ist. Gegenüber Anthraquinon scheinen Fibroblasten äußerst resistent zu sein.

Die kalorimetrische Methode ist empfindlich genug, um eine Sensibilitätsreihenfolge für die Pharmaka festzulegen (Tab. 4). Dabei zeigt sich, dass diese Reihenfolge die gleiche ist, die auch Studien zur Überlebensrate nach Behandlung mit diesen Pharmaka ergeben haben (Pätel, 1981). Toxische Effekte treten aber erst bei höheren Konzentrationen auf. Bis auf Anthralindimer und Anthraquinon, die bis $20 \mu\text{M}$ keine Zelltötung hervorrufen, sind bei den anderen Pharmaka die $K_{0,5}$ -Werte der Wärmeproduktion nur halb so groß wie die Werte der halbmaximalen Zelltötung.

Jacques & Reichert (1981) haben an proliferierenden Kulturen menschlicher Fibroblasten eine Hemmung des Thymidineinbaus in die DNA nach Behandlung mit Anthraquinon, Acetylanthralin, Anthralin und dem Dimer gemessen. Sie fanden um eine

Zehnerpotenz niedrigere $K_{0,5}$ -Werte. Der Hemmung des Thymidineinbaus liegt also ein anderer Mechanismus zugrunde als der Inhibition der Wärmeentwicklung. Deshalb sind wachsende Fibroblasten auch sensibler als ruhende.

Da kalorimetrische Ergebnisse bereits einige Stunden nach der Zugabe des Pharmakons vorliegen, ist diese Methode bedeutend schneller als herkömmliche Techniken: Ergebnisse zur Hemmung des Thymidineinbaus, zur Bestimmung der Überlebensrate oder zur Messung des Proteingehalts liegen erst nach einigen Tagen vor.

Der wesentlichste Vorteil einer kalorimetrischen Messung liegt aber darin, daß nach der Applikation des Pharmakons die Meßwertgewinnung völlig automatisch erfolgt. Es sind keine weiteren Manipulationen erforderlich. Das gemessene Signal, die Wärmeentwicklung, wird von der Kultur immer abgegeben, unabhängig ob eine Messung stattfindet oder nicht. Anders verhält es sich bei Untersuchungen, wo der Einbau radioaktiver Bausteine verfolgt oder der Stoffwechsel photometrisch erfaßt wird.

Kalorimetrisches Screening erlaubt deshalb nicht nur, ergänzende Daten zum Stoffwechsel zu gewinnen, sondern kann als selbständige Standardtechnik auch schnelle Einblicke in Wirkungszusammenhänge pharmakologisch interessanter Therapeutika geben.

Damit sich die Mikrokalorimetrie auch auf diesem Gebiet erfolgreich durchsetzt, ist aber eine noch bessere Kenntnis des Energiestoffwechsels von in vitro-Kulturen vertebraler Zellen unerlässlich. Wünschenswert wäre darüberhinaus, daß es durch geeignete Kalorimeter möglich wird, auch den aeroben Stoffwechsel zu erfassen.

In dieser Arbeit wurde der Energiestoffwechsel von in vitro-Kulturen dermalen Fibroblasten des Menschen mit Hilfe kalorimetrischer, manometrischer, polarographischer und enzymatischer Methoden untersucht. Dabei wurde insbesondere der Einfluß des Antipsoriatikums Anthralin und vier seiner Derivate erfaßt und mit der Anthralinwirkung auf Hefen verglichen.

Im einzelnen kann folgendes festgestellt werden:

1. Das Wachstum von Fibroblastenkulturen kann kalorimetrisch verfolgt und interpretiert werden.
2. Ruhende Fibroblasten im konfluenten Monolayer haben unter anaeroben und aeroben Bedingungen eine Wärmeproduktionsrate von 50 pW/Zelle, proliferierende Fibroblasten setzen anaerob 66 pW/Zelle frei.
3. Fibroblasten binden oder inaktivieren das im Medium vorhandene Anthralin in ca. zwei Minuten.
4. In Abhängigkeit von der Konzentration hemmt Anthralin zuerst die Atmung, dann die Gärung und schließlich die Überlebensfähigkeit der Zellen irreversibel.
5. Kulturen, bei denen Zellatmung überwiegt, sind gegenüber Anthralin empfindlicher ($K_{0,5} = 1 \mu\text{M}$) als anaerobe Kulturen ($K_{0,5} = 7 \mu\text{M}$), deren Wärmeproduktion vor allem auf Fermentation beruht.
6. Die Atmungshemmung - nicht aber die Überlebensfähigkeit der Fibroblasten - ist vom Sauerstoffgehalt des Mediums abhängig.
7. Polarographisch kann die Atmungshemmung wesentlich schneller und präziser erfaßt werden als manometrisch.
8. Durch Anthralin atmungsgeschädigte Zellen können nicht mehr

von Atmung auf Gärung umschalten.

9. Die untersuchten Anthralinderivate zeigen auf die Wärmeabgabe ruhender Fibroblasten stärkere, gleiche oder keine Wirkung.
10. Kalorimetrisch kann der Einfluß eines Pharmakons auf den Energiestoffwechsel bedeutend schneller und mit weniger Arbeitsaufwand bestimmt werden als mit herkömmlichen Techniken.
11. Proliferierende und ruhende Hefen nehmen Anthralin ähnlich schnell auf wie Fibroblasten.
12. Anthralin hemmt das Wachstum von Hefen.
13. Ruhende Hefepopulationen zeigen nach Anthralinbehandlung eine Verminderung ihrer Atmung, ihrer Gärung und ihrer Überlebensfähigkeit.
14. Bei Hefen besteht bezüglich der Sensibilität von Atmung, Gärung und Überlebensfähigkeit die gleiche Reihenfolge wie bei Fibroblasten. Zur halbmaximalen Hemmung sind allerdings höhere Konzentrationen erforderlich.
15. Für bestimmte Konzentrationsbereiche von Anthralin wird bei Hefen eine Stimulation des Sauerstoffverbrauchs und der Kohlendioxidbildung beobachtet.
16. Gewisse Anthralineinflüsse auf den Energiestoffwechsel von Eukaryoten sind wahrscheinlich genereller Natur, während andere Effekte von der untersuchten Spezies und vom Zelltyp abhängen können.

In the present paper the energy metabolism of human dermal fibroblasts in monolayer culture was investigated by calorimetric, manometric, polarographic, and enzymatic techniques.

The development of cultures may be recorded by means of a batch calorimeter giving rise to a characteristic heat profil. The heat output in stationary phase is about 50 pW/cell under aerobic and anaerobic conditions. In aerobiosis the oxygen consumption rate is 2 fl/s . cell.

The addition of anthralin to the culture results in a decrease of cellular respiration, fermentation, and survival. The effect is irreversible. Cultures under anaerobic conditions are more resistant to anthralin, because the sensitivity of the cells is of following order: respiration > fermentation > cell survival.

The influence of some anthralin derivatives on the general metabolism is demonstrated calorimetrically. Calorimetric screening seems to be quicker and less laborious than conventional techniques.

By comparing anthralin effects on fibroblasts to those on yeast cells some general aspects of the drug treatment on eucaryotic cells are discussed.

Dans le travail présent le métabolisme d'énergie des fibroblastes du derme humain a été examiné par des techniques calorimétriques, manométriques, polarographiques et enzymatiques.

La croissance des cultures peut être enregistrée avec un calorimètre du type 'batch' montrant une thermogramme caractéristique. Dans la phase stationnaire la production de chaleur en anaérobiose et aérobie est environ 50 pW/cellule. Le taux de consommation d'oxygène en aérobie est 2 fl/s . cellule.

L'addition de l'anthraline à la culture diminue la capacité des fibroblastes de respirer, de fermenter et de survivre. L'effet est irréversible. Dans les conditions anaérobiques les cultures sont plus résistantes à l'anthraline, parce que la sensibilité des cellules est de l'ordre suivant: respiration > fermentation > survie de cellule.

L'influence de quelques analogues d'anthraline sur le métabolisme global est suivie calorimétriquement. Ce test calorimétrique, destiné à mettre en évidence l'action exercée par ces analogues, semble être plus rapide et moins laborieux que des techniques établies.

Quelques aspects communs du traitement des cellules eucaryotiques sont discutés en comparant l'effet de l'anthraline sur les fibroblastes et sur la levure.

7. LITERATURVERZEICHNIS

- Anders, A., G. Welge, B. Schaarschmidt, I. Lamprecht & H. Schaefer (1977) Calorimetric investigations of metabolic regulation in human skin. In: Applications of calorimetry in life sciences. I. Lamprecht & B. Schaarschmidt (Hrsg.) de Gruyter, Berlin
- Anders, A., H. Schaefer, B. Schaarschmidt & I. Lamprecht (1979) Microcalorimetric investigations of the metabolism of isolated human epidermis. Arch. Dermatol. Res. 265, 173
- Azzarone B. & A. Macieira-Coelho (1982) Heterogeneity of the kinetics of proliferation within human skin fibroblastic cell populations. J. Cell. Sci. 57, 177
- Banks, P., W. Bartley & L.M. Birt (1979) The biochemistry of the tissues. John Wiley & Sons, Chichester-New York-Brisbane-Toronto
- Beezer, A.E. & B.Z. Choudhry (1980) Microcalorimetric investigations of drugs. In: Biological Microcalorimetry. A.E. Beezer (Hrsg.) Academic Press, London-New York-Toronto-Sydney-San Francisco
- Belaich, J.P. (1980) Growth and metabolism in bacteria. In: Biological Microcalorimetry. A.E. Beezer (Hrsg.) Academic Press, London-New York-Toronto-Sydney-San Francisco
- Bettelheim, K.A. & E.J. Shaw (1980) Microcalorimetry in diagnostic medical microbiology. In: Biological Microcalorimetry. A.E. Beezer (Hrsg.) Academic Press, London-New York-Toronto-Sydney-San Francisco
- Cavey, D., J.C. Caron & B. Shroot (1981) Anthralin: chemical instability and glucose-6-phosphate dehydrogenase inhibition. Brit. J. Dermatol. 105, Suppl. 20, 15
- Ciesielski-Treska J., N. Nissen, L. Hertz, G. Tholey & P. Mandel (1972) Evolution de la respiration de cellules de neuroblastome en culture au cours de la différenciation. J. Physiol. (Paris) 65, Suppl. 1, 108 A
- Clark, L.C. (1956) Monitor and control of blood and tissue

- oxygen tension. Trans. Am. Soc. Artif. Int. Organs 2, 41
- Clark, J.M. & P.C. Hanawalt (1981) Inhibition of DNA replication and repair in cultured human cells by anthralin or danthron. Brit. J. Dermatol. 105, Suppl. 20, 49
- Delieu, C. & D. Walker (1972) An improved cathode for the measurement of oxygen evolution. New Phytologist 71, 201
- Dell'Orco, R.T., J.G. Mertens & P.F. Kruse Jr. (1973) Maintenance of diploid fibroblast cultures as nonmitotic populations. In: Tissue Culture. P.F. Kruse & M.K. Patterson (Hrsg.) Academic Press, New York-San Francisco-London
- Donnelly, M. & I.E. Scheffler (1976) Energy metabolism in respiration-deficient and wild-type Chinese hamster fibroblasts in culture. J. Cell. Physiol. 89, 39
- Dykes, P.J., G.P. Roberts & R. Marks (1981) Anthralin cytotoxicity. Brit. J. Dermatol. 105, Suppl. 20, 43
- Ehrlich, K.C., E. Stewart & E. Klein (1978) Artificial capillary perfusion cell culture: metabolic studies. In Vitro 14, 443
- Epshtein, I.M. (1978) The oxygen effect and adaptation reaction of cells. Report 3. Stimulation of cellular oxygenation with reference to respiratory activity and permeability to oxygen. Radiobiology (Radiobiologija) 18, 54
- Finkelstein, M.C. (1981) The uptake of L-glutamic acid by LM (TK⁻) mouse fibroblasts. Physiology 9, 27
- Freinkel, R.K. (1960) Metabolism of glucose-C-14 by human skin in vitro. J. Invest. Dermatol. 34, 37
- Gazzola, G.C., V. Dall'Asta & G.C. Guidotti (1980) The transport of neutral amino acids in cultured human fibroblasts. J. Biol. Chem. 3, 929
- Gilbert, D. (1962) Studies on the pathway of glucose respiration in cattle skin. J. Invest. Dermatol. 38, 123
- Gilberg, B.O., G. Zetterberg & G. Swanbeck (1967) Petite mutants induced in yeast by dithranol (1,8,9-trihydroxy-anthracene) an important therapeutic agent against psoriasis. Nature 214, 415

- Gregg, C.T. (1972) In: Growth, nutrition and metabolism of cells in culture. Vol. I. G.H. Rothblat & V.J. Christofalo (Hrsg.) Academic Press, New York-San Francisco-London
- Griffiths, J.B. & S.J. Pirt (1967) The uptake of amino acids by mouse cells (strain LS) during growth in batch culture and chemostat culture: the influence of cell growth rate. *Proc. R. Soc. London (Biol.)* 168, 421
- Ham, R.G. (1980) Dermal fibroblasts. In: Methods in cell biology. Vol. 21A. Academic Press, New York-London-Toronto-Sydney-San Francisco
- Hayflick, L. (1973) Subculturing human diploid fibroblast cultures. In: Tissue culture. P.F. Kruse & M.K. Patterson (Hrsg.) Academic Press, New York-San Francisco-London
- Hellgren, L., K. Larsson & J. Vincent (1977) Influence of some inflammatory or antiinflammatory substances on skin biopsies. Investigated with microcalorimetry and respiratory substances. *Arch. Derm. Res.* 258, 295
- Herdenstam, C.G. (1962) On the in vitro metabolism of labelled glucose in normal and psoriatic skin slices. *Acta Derm.-venereol. (Stockholm)* 42, 47
- Herrmann, F., H. Ippen, H. Schaefer & G. Stüttgen (1973) Biochemie der Haut. Georg Thieme Verlag, Stuttgart
- Johnson, M.J. (1972) Continuous measurement of dissolved oxygen. In: Manometric & biochemical techniques. W.W. Umbreit, R.H. Burris & J.F. Stauffer (Hrsg.) Burgess Publishing Company, Mineapolis
- Kemp, R.B. (1980) Microcalorimetric studies of tissue cells in vitro. In: Biological microcalorimetry. A.E. Beezer (Hrsg.) Academic Press, London-New York-Toronto-Sydney-San Francisco
- Kleiber, M. (1967) Der Energiehaushalt von Mensch und Haustier. Verlag Paul Parey, Hamburg-Berlin
- Klem, E.B. (1978) Effects of antipsoriatic drugs and metabolic inhibitors on the growth of epidermal cells in culture. *J. Invest. Dermatol.* 70, 27
- Krebs, A. & H. Schaltegger (1969) Untersuchungen zur Struktur-spezifität der Psoriasisheilmittel Chrysarobin und Dithra-

- nol. Hautarzt 20, 204
- Lagunas, R. (1979) Energetic irrelevance of aerobiosis for *S. cerevisiae* growing on sugars. Mol. Cell. Biochem. 3, 139
- Lamprecht, I. (1980) Growth and metabolism in Yeasts. In: Biological microcalorimetry. A.E. Beezer (Hrsg.) Academic Press, London-New York-Toronto-Sydney-San Francisco
- Ljungholm, K., I. Wadsö & L. Kjellén (1978) Acta Pathol. Microbiol. Scand., sect. B 86, 121, zit. in Schaarschmidt & Reichert
- Martin, G.M. (1973) Human skin fibroblasts. In: Tissue culture. P.F. Kruse & M.K. Patterson (Hrsg.) Academic Press, New York-San Francisco-London
- Mayer, U.M. & K. Sames (1981) Sauerstoffverbrauch und Alterung in Langzeitkulturen von Linsenepithel. Graefes Arch. Klin. Ophthalmol. 217, 117
- Merz, R. & F. Schneider (1982) Growth characteristics of in vitro culture Ehrlich Ascites tumor cells under anaerobic conditions and after Reaeration. Z. Naturforschung 37c, 326
- Mier, P.D. & D.W.K. Cotton (1976) The molecular biology of skin. Blackwell Scientific Publications, Oxford-London-Melbourne
- Mills, A.K. & H. Krebs (1965) Aspects of Yeast metabolism. Blackwell Scientific Publications, Oxford
- Montini, J., J. G. Bagby & J.J. Spitzer (1981) Importance of exogenous substrates for the energy Production of adult rat heart Myocytes. J. Mol. Cell. Cardiol. 13, 903
- Newell, R.D. (1980) The identification and characterization of microorganisms by microcalorimetry. In: Biological microcalorimetry. A.E. Beezer (Hrsg.) Academic Press, London-New York-Toronto-Sydney-San Francisco
- Nikolić, D. & B. Nešković (1976) Some measurements and calculations of change in enthalpy during growth, development and division of mammalian cells. Jugoslav. Physiol. Pharmacol. Acta 12, 191
- Oizumi, J., T.A. Giudici, W.G. Ng, K.N.F. Shaw & G.N. Donnell (1981) Propionate metabolism by cultured skin fibroblasts

from normal individuals and patients with methylmalonicaciduria and propionicaemia. *Biochem. Med.* 26, 28

- Pätel, M. U. Reichert, B. Schaarschmidt & I. Lamprecht (1980) Heat production of human epidermis slices and skin-cell cultures. In: *Thermal analysis, Proceedings of the sixth international conference on thermal analysis, Vol. II*, Birkhäuser Verlag, Basel
- Patel, M. (1981) Calorimetric screening test for dermatologically active drugs on human skin fibroblast cultures. *Thermochi. Acta* 49, 123
- Pätel, M., B. Schaarschmidt & U. Reichert (1981) Calorimetric and manometric measurements on human skin fibroblasts in culture. *Brit. J. Dermatol.* 105, Suppl. 20, 60
- Pätel, M., B. Schaarschmidt & I. Lamprecht (1982) Microcalorimetric experiments on skin cells. Influence of drugs on heat production. In: *Thermal analysis, Proceedings of the seventh international conference on thermal analysis, Vol. II*, John Wiley & Sons, Chichester-New York-Brisbane-Toronto-Singapore
- Pomerantz, S.H. & M.T. Asbornson (1961) Glucose metabolism in young rat skin. *Arch. Biochem.* 93, 147
- Pouyssegur, J., A. Franchi, J.C. Salomon & P. Silvestre (1979) Isolation of a chinese hamster fibroblast mutant defective in hexose transport and aerobic glycolysis: its use to dissect the malignant phenotype. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77, 2698
- Raab, W. (1969) Die Wirkung externer Antipsoriatika auf die Gewebsatmung menschlicher und tierischer Haut. *Arch. Klin. Dermatol.* 234, 44
- Reis, A. (1975) Bioenergetischer Toxizitätstest zum Nachweis der Wirkung von Pharmaka und toxischen Substanzen auf den Energiestoffwechsel von Hefen. *G-I-T fachz. Labor.* 9, 758
- Reitzer, L.J., B.M. Wice & D. Kennell (1980) The pentose cycle. Control and essential function in HeLa cell nucleic acid synthesis. *J. Biol. Chem.* 255, 5616
- Rose, A.H. & J.S. Harrison (Hrsg.) (1969) *The yeasts*. Academic

- Schaarschmidt, B., I. Lamprecht & M. Simonis (1979) Kalorimetrische Messungen zum Einfluß von Nystatin auf den Energiestoffwechsel von Hefen. In: Angewandte chemische Thermodynamik und Thermoanalytik. E. Marti, H.R. Oswald & H. G. Wiedemann (Hrsg.) Experientia Suppl. 37, Birkhäuser Verlag, Basel-Boston-Stuttgart
- Schaarschmidt, B. & U. Reichert (1981) Heat evolution by human skin fibroblasts in monolayer culture. Exp. Cell. Res. 131, 480
- Schachtschabel, D.O. & E. Kuerschner (1972) Über den Einfluß Hypertoner Nährmedien auf den Glukose- und O_2 -Verbrauch von Ehrlich-Ascites Tumor-Zellen in Langzeitkultur. Hoppe-Seylers Z Physiol. Chem. 353 (1), 751
- Semenitz, E. (1978) Mikrokolorimetrische Untersuchungen zur Charakterisierung der antibakteriellen Wirksamkeit von Chemotherapeutika. Immunität und Infektion 6, 260
- Semenitz, E. & F. Tiefenbrunner (1977) Mikrokolorimetrische Untersuchungen zur Bestimmung der antibakteriellen Aktivität von Chemotherapeutika. Arzneimittel-Forschung/Drug-Research 27, 2247
- Sinclair, R. (1980) Glucose metabolism and dehydrogenase activities in the cytosol and mitochondria of mouse LS cells in chemostat culture. In Vitro 16, 1076
- Sly, W.S. & J. Grubb (1979) Isolation of fibroblasts from patients. In: Methods in enzymology, Vol. LVIII, Cell culture. W.B. Jakoby & J.H. Pastan (Hrsg.) Academic Press, New York-San Francisco-London
- Swanbeck, G. & N. Thyresson (1965) Interaction between dithranol and nucleic acids. A possible mechanism for the effect of dithranol on psoriasis. Acta Dermatol. Venereol. 45, 344
- Swanbeck, G. & G. Zetterberg (1971) Studies on dithranol and dithranol-like compounds. I. Binding to nucleic acids. Acta Dermatol. Venereol. 51, 41
- Umbreit, W.W., R.H. Burris & J.F. Stauffer (1972) Manometric &

biochemical techniques. Burgess Publishing Company,
Mineapolis

- van Wezel, A.L. (1973) Microcarrier cultures of animal cells.
In: Methods and applications of tissue culture. P.F.
Kruse & M.K. Patterson (Hrsg.) Academic Press, New York
- Warburg, O. (1926) Über den Stoffwechsel der Tumoren. Springer
Verlag, Berlin
- Werrlein, R.J. & A.D. Glinos (1974) Oxygenmicroenvironment
and respiratory oscillations in cultured mammalian cells.
Nature 251 (5473), 317
- Woledge, R.C. (1980) The heat production of intact organs and
tissues. In: Biological microcalorimetry. A.E. Beezer
(Hrsg.) Academic Press, London-New York-Toronto-Sydney-
San Francisco
- Jacques, Y. & U. Reichert (1981) Effekts of anthralin and ana-
logues on growth and (³H)-Thymidin incorporation in human
skin fibroblasts. Brit. J. Dermatol. 105, Suppl. 20, 45
- Yardley, H.J. & G. Godfrey (1964) Metabolism of phosphate es-
ters and phospholipids in skin maintained in vitro. J.
Invest. Dermatol. 43, 51
- Zetterberg, G. (1977) Effects of an antipsoriatic agent, dithre-
nol, on mitochondrial and nuclear functions in yeast cells.
Hereditas 86, 191
- Zetterberg, G. (1981) Effects of anthralin on mitochondrial and
nuclear functions in yeast cells. Brit. J. Dermatol. 105,
Suppl. 20, 39
- Zielke, H.R., P.T. Ozand, J.T. Tildon, D.A. Sevdalian & M. Corn-
blath (1978) Reciprocal regulation of glucose and glutamine
utilization by cultured human diploid fibroblasts. J. Cell.
Physiol. 95, 41

Teil I: Versuche zur Anthralinstabilität

Eine mit Essigsäure als Lösungsmittel hergestellte Stammlösung ist über viele Stunden stabil. Sobald die Stammlösung aber mit einem Kulturmedium auf 0,1 % bzw. 0,2 % verdünnt wird, unterliegt Anthralin vielen Umwandlungsprozessen. Die Instabilität des eingewogenen Anthralins ($10 \mu\text{g/ml}$) wurde chromatographisch (HPLC) verfolgt.

In einer Stunde nimmt die Anthralinkonzentration auf 66 % ab, wenn die Stammlösung mit 100 mM-GPP verdünnt wird (Abb. 51). Wesentlich weniger stabil ist Anthralin in VM und KM. Nach ca. 30 Minuten wird kein freies Anthralin mehr gefunden.

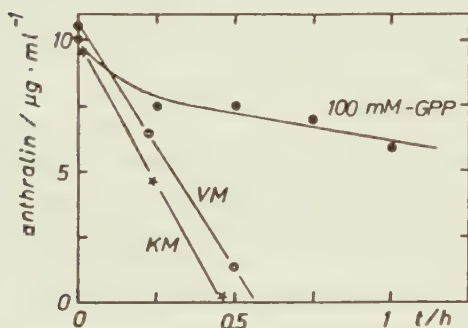


Abb. 51: Anthralinzerfall über der Zeit bei 30 °C in VM und 100 mM-GPP und bei 37 °C in KM

Eine ähnliche Degradation des Anthralins fanden auch Jacques & Reichert (1981), bei denen das serumfreie Medium zwei Stunden später 13 % Anthraquinon, 17 % Dimer und 50 % nicht identifizierbare Produkte enthielt.

Kälberserum, sowie Peptone und Hefeextrakt scheinen sich auf Anthralin destabilisierend auszuwirken. Ebenso verstärken auch Licht, höhere Wasserstoffionenkonzentrationen und höhere Temperaturen den Anthralinzerfall im Medium. In anthralinhaltigem KM, daß nicht mit NaOH neutralisiert wurde, kann nach einer Stunde noch ca. 20 % der eingewogenen Menge gemessen werden.

Die Lösungsmittel Ethanol und Aceton sind ohne Einfluß auf die Stabilität, obwohl die mit Ethanol hergestellte Stammlösung

nach drei Stunden ca. 10 % weniger Anthralin enthält (Cavey et al., 1981).

Wenn anthralinhaltiges Medium sofort nach seiner Herstellung benutzt wird, und die Aufnahme des Pharmakons durch die Zellen sehr schnell erfolgt, spielt die Instabilität des Anthralins in den hier benutzten Medien eine untergeordnete Rolle. Die auftretenden Effekte werden also nicht von den Degradationsprodukten hervorgerufen. Unklar bleibt aber, welchen Umwandlungen Anthralin in der Zelle unterworfen ist, so daß es nicht das eigentlich wirksame Therapeutikum sein muß.

Teil II: Temperaturkonstanz und Kalibrierung der Kalorimeter

Vorraussetzung jeder Messung mit isothermen Kalorimetern ist die Temperaturkonstanz des Geräts. Temperaturschwankungen wirken sich sofort auf die Nulllinie aus (Kammern mit sterilem, destilliertem Wasser gefüllt).

Die Aufstellung des Bioflux-Batch-Kalorimeters in einen klimatisierten Raum (Abb. 52a) und eine Korkumwandung des Reaktionsgehäuses mit Temperierung über ein Wasserbad (Abb. 52b) reichen zur Stabilisierung der Nulllinie nicht aus. Zusätzlich mußte das Kalorimeter in eine Styroporkiste gestellt werden (Abb. 52c). Die regelmäßigen Schreiberauslenkungen der Abb. 52b und 52c beruhen auf Spannungsimpulsen beim Ein- bzw. Ausschalten der Wasserbadheizung.

Ohne Anschluß des externen Wasserbades ergeben sich auch beim Flow-Kalorimeter Tag-Nacht-Oszillationen der Nulllinie (Abb. 53a), die erst verschwinden, wenn im klimatisierten Raum das kalorimereigene Luftbad zusätzlich extern temperiert wird (Abb. 53b und 53c).

Zur Kalibrierung der Kalorimeter wurde der Joule-Effekt benutzt. Durch Spannungs- (U) und Strommessung (I) mit Präzisionsmeßgeräten wurde die in der Kammer abgegebene Leistung ($P = U \cdot I$) ermittelt, und diese mit der Schreiberauslenkung für eine gewählte Schreiberempfindlichkeit (z.B. $100 \mu V / 25 \text{ cm}$) verglichen. Aus der Auftragung der Schreiberauslenkung (μV) über der

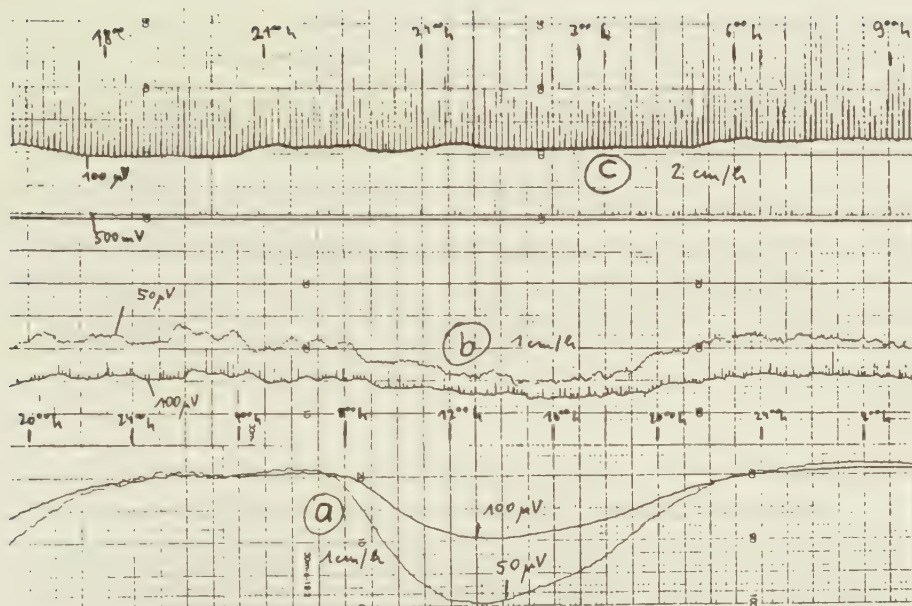


Abb. 52: Batch-Kalorimeter: Nulllinienabhängigkeit von der Temperatur des Geräts, Einzelheiten s. Text

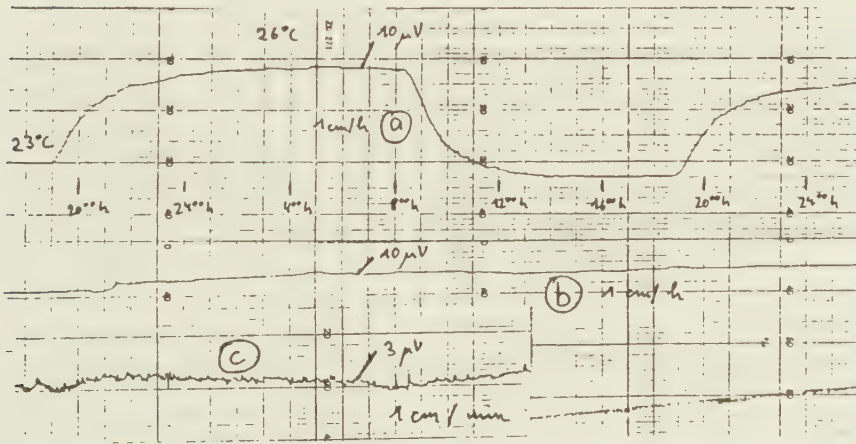


Abb. 53: Flow-Kalorimeter: Nulllinienabhängigkeit von der Temperatur des Geräts, Einzelheiten s. Text

jeweiligen Jouleschen Leistung (mW) ergibt sich eine Gerade, deren Steigung der Empfindlichkeit des Geräts entspricht:
 Batch-Kalorimeter: $60,7 \mu\text{V/mW}$, Flow-Kalorimeter: $63,4 \mu\text{V/mW}$.

Die vorliegende Arbeit entstand am Centre International de Recherches Dermatologiques in Valbonne und am Institut für Biophysik der Freien Universität Berlin, deren Direktoren, Herrn Prof. Hans Schaefer und Herrn Prof. Ingolf Lampracht, ich für die Aufnahme in ihre Institute, für die Beschaffung des Stipendiums und für die Betreuung während der Arbeit verbunden bin.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Bernd Schaarschmidt, der durch viele anregende Gespräche den Fortgang der Arbeit wesentlich bestimmt hat, sowie Herrn Dr. Uwe Reichert und Herrn Dr. Yannick Jacques, die mir in Fragen der Fibroblastenkultur hilfreich zur Seite standen.

Herrn Dr. Braham Shroot sei für die Überlassung der Pharmaka gedankt. Für ihre Hilfe bei der chromatographischen Analyse, bei technischen Fragen zu den Geräten und bei der Erstellung des Programms zur Auswertung der Warburgversuche danke ich herzlich den Herrn Jean-Claude Caron und Dr. Jean-Claude Bernengo.

Frau Christa Umlauf hat dankenswerter Weise die zahlreichen Abbildungen angefertigt.

Inbesondere möchte ich auch meiner Frau danken, die mich durch ihre Geduld und Ungeduld gleichermaßen motiviert hat.

LEBENS LAUF

Persönliche Daten:

Name	Michael Ronald Pätel
Geburtsdatum und -ort	24.05.1952, Berlin
Familienstand	verh., drei Kinder

Schullaufbahn:

Einschulung in Berlin	April 1959
Besuch einer Realschule in Hamburg	April 1963 - April 1969
Besuch des Albert-Schweitzer-Gymnasiums in Berlin	April 1969 - Jan. 1972
Hochschulreife	14.01.1972

Studiengang:

Einschreibung an der FU-Berlin für das Fach Biologie	April 1972
Vordiplom	17.05.1974
Studium der Genetik und der Biochemie an der Université Paris VI	Okt. 1974 - Sept. 1975
Fortsetzung des Biologiestudiums an der FU-Berlin	Okt. 1975
Anfertigung einer Diplomarbeit am Institut für Biophysik der FU	Feb. 1976 - Feb. 1978
Diplomhauptprüfung	01.12.1978
Vorbereitung einer Dissertation am Fachbereich Veterinärmedizin und am Institut für Biophysik der FU	Feb. 1979 - Mai 1979
Forschungsaufenthalt am Centre International de Recherches Dermatologiques in Valbonne als DAAD- und CIRD-Stipendiat	Okt. 1979 - Mai 1981
Fortführung der Doktorarbeit am Institut für Biophysik der FU	Aug. 1981 - Feb. 1983
Promotion	08.09.1983

Nebentätigkeiten:

Tutor am Institut für Biophysik der FU-Berlin	April 1977 - März 1979
Wissenschaftlicher Angestellter der FU-Berlin	Mai 1979 - Okt. 1979
Lehrer für Biologie	mehrmals, kurzfristig

